УДК 619:57.086.8

ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК), ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ЗУБОВ СВИНЕЙ

Сергеев М.А. – к.вет.н., доцент, Амиров Д.Р. – к.вет.н., доцент, ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», Тимофеева А.В. - лаборант-исследователь НИЛ «ОрепLав Генные и клеточные технологии», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Ключевые слова: свиньи, мезенхимные стволовые клетки, жировая ткань, пульпа зуба. *Keywords*: pigs, mesenchymal stem cells, adipose tissue, tooth pulp.

РЕФЕРАТ







Одно из наиболее развивающихся современных направлений регенеративной медицины - терапия стволовыми клетками. Каждая такая клетка способна к неограниченному или частично ограниченному самообновлению и образованию нескольких типов дифференцированных здоровых потомков. Мезенхимные стволовые

клетки (МСК) являются наиболее подходящими для клеточной терапии. МСК обладают следующими положительными свойствами, которые позволяют этим клеткам способствовать регенерации аксонов: секреция различных нейротрофических факторов и цитокинов, способность дифференцироваться в различных направлениях, иммуномодулирующий, противовоспалительный и антиапоптотический эффекты. Проведенные нами исследования показали, что первичные культуры мезенхимных стволовых клеток (МСК), полученных из жировой ткани и пульпы зуба, обладают сходными морфофенотипическими характеристиками и экспрессируют специфические для МСК маркеры CD44, CD29 и Thy-1.

Через сутки после посева клеток, прикрепившиеся клетки, полученные из жировой ткани, имели вытянутую форму с несколькими отростками, располагались одиночно или небольшими группами. При дальнейшем культивировании данные клетки начинали делиться и распластывались по поверхности пластика, увеличивались в размерах. Первичная культура МСК, полученных из пульпы зуба, начинала появляться через 5-10 дней, мигрируя из ферментативно вываренной ткани прикрепленной ко дну планшета. Жизнеспособность МСК, полученных из жировой ткани и пульпы зуба свиньи, к 3 пассажу составила не менее 96%.

Учитывая полученные результаты при культивировании клеток можно ожидать, что при внесении в зону поврежденного сегмента спинного мозга клетки-предшественники нейронов, полученные из МСК, будут активно способствовать регенерации нервной ткани и восстановлению её функциональности.

ВВЕДЕНИЕ

Низкие результаты многих традиционных методов лечения различных заболеваний побуждают науку к поиску наиболее эффективных методик терапии.

Одно из наиболее развивающихся современных направлений регенеративной медицины - терапия стволовыми клетками. Каждая такая клетка способна к неограниченному или частично ограниченному самообновлению и образованию нескольких типов дифференцированных здоровых потомков. Существуют многочисленные источники стволовых клеток, включая костный мозг, жировую ткань, мышцы, печень, пуповинную и периферическую кровь, а также другие специфические ткани [1, 2, 3].

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются наиболее подходящими для клеточной терапии. МСК обладают следующими положительными свойствами, которые позволяют этим клеткам способствовать регенерации аксонов: секреция различных нейротрофических факторов и цитокинов, способность дифференцироваться в различных направлениях, иммуномодулирующий, противовоспалительный и антиапоптотический эффекты [4]. Популяции МСК были выделены из различных источников, таких как костный мозг, жировая ткань, пуповина и периферическая кровь, зубные ткани и др. [5, 6]. В настоящее время остаются ещё не решенными вопросы, касающиеся оптимальных источников получения МСК, метода выделения, эффективной дозы, и способа их трансплантации к очагу поражения, решение которых позволит добиться значительного улучшения состояния пашиентов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВА-НИЙ

Эксперименты выполнены на 9 свиньях вьетнамской вислобрюхой породы в возрасте 5 -6 месяцев, с массой тела 15-20 кг.

Содержание и работу с животными проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS №123) и закона «О ветеринарии РФ». Животных содержали в клинике Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана в

соответствии с зооветеринарными требованиями.

Для получения биопсийного материала свиней вводили в интубационный наркоз с предоперационной подготовкой и адекватным обезболиванием.

Взятие жировой ткани проводили путем иссечения лоскута кожи шириной 3 см и длинной 5 см вместе с подкожной клетчаткой из подкожной клетчатки в области вентролатеральной поверхности шеи.

Для получения мезенхимальных стволовых клеток из пульпы зуба проводили экстракцию верхних и нижних резцов — средних и окраек с обеих сторон. Для этого проводили лигаментотомию и тракцию зуба.

Подкожную жировую клегчатку и удаленные зубы доставляли в лабораторию в сумкехолодильнике при 4° С в растворе α -МЕМ с гентамицином в течение 1 часа.

Выделение, культивирование и фенотипирование МСК из жировой ткани и пульпы зуба проводили в лаборатории кафедры генетики Казанского Федерального Университета (Институт фундаментальной медицины и биологии).

Все манипуляции по выделению МСК из жировой ткани и пульпы зуба проводились в стерильных условиях при ламинарном токе воздуха.

Жировую ткань подвергали тщательной механической гомогенизации, добавляли к ней 5 мл стерильного 0,9%-ного раствора хлорида натрия и проводили трехкратное центрифугирование с дальнейшим отбором солевого раствора и осадка с клетками крови. К полученному гомогенизату жировой ткани добавляли свежеприготовленный стерильный 0,2%-ный раствор коллагеназы из печени камчатского краба в стерильном фосфатно-солевом буфере Dulbecco без ионов Ca2+ и Mg2+, после чего гомогенат инкубировали 60 мин при 37°С при постоянном помешивании на качающейся платформе.

Полученный в результате ферментации раствор вновь центрифугировали 5 мин при 500g. Полученную стромальнососудистую фракцию отмывали от фермента. После двухкратного повторения указанного этапа, осуществляли посев

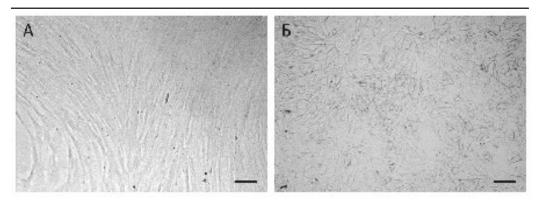


Рис. 1. Культура МСК первого пассажа: А) из жировой ткани; Б) из пульпы зуба (световая микроскопия; масштаб: 100 мкм).

Таблица 1 Данные проточной цитофлуориметрии по экспрессии поверхностных антигенов в клетках, полученных из жировой ткани и пульпы зуба свиней

Источник МСК	CD44	CD29	Thy-1	CD34	CD45
Жировая ткань	86,7±8,5%	40,0±27%	94,0±4%	0%	1,5±0,5%
Пульпа зуба	94,0±3%	50,0±11%	80,5±10,5%	0%	3,0±1%

клеток на среду содержащую α-МЕМ, дополненной 10% FBS (фетальная телячья сыворотка), 1х GlutaMAX, 100 мкМ L-аскорбат-2-фосфата, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. В процессе культивирования клеток питательные среды меняли 2 раза в неделю.

Из полученных зубов свиней выделяли пульпу и подвергали ее ферментативному расщеплению при помощи коллагеназы I типа (3 мг/мл) и диспазы (4 мг/мл) в PBS в течение 1 часа при 37°С и 5% CO2.

Полученный раствор центрифугировали 5 минут при 200g, супернатант и ферменты удаляли, а оставшиеся клетки культивировали, так же как и МСК из жировой ткани.

Идентификацию клеток проводили методом световой микроскопии с окраской ядер DAPI. Фенотип полученных клеток подтверждали методом проточной цитофлуориметрии на аппарате BD Ассигі С6, проводили оценку экспрессии полученными клетками следующих маркеров: CD29, CD44 и Thy-1. За культурой осуществляли ежедневное наблюдение с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали проведенные исследования, через 24 часа после посева, клетки, полученные из жировой ткани, были расположены одиночно или небольшими группами. На вторые сутки они начинали делиться, образуя островки. При этом все клетки были схожи морфологически, имели небольшой размер и вытянутую веретеновидную форму с несколькими отростками.

При дальнейшем культивировании клетки увеличивались в размерах, но сохраняли фибробластоподобную морфологию. Характерные для МСК параметры, культивируемые клетки сохраняли на протяжении как минимум 6 пассажей.

К 5-10-м суткам культивирования наблюдали миграцию клеток из пульпы зуба на периферию. Вся периферия во-

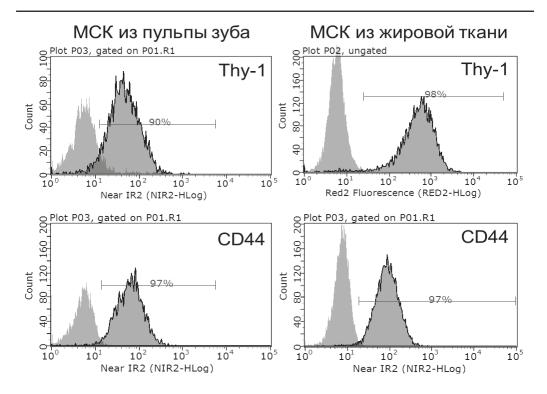


Рис. 2. Экспрессия Thy-1 и CD44 в культурах MCK, полученных из жировой ткани и пульпы зуба свиней (по оси абсцисс — интенсивность флуоресценции, отражающая уровень экспрессии поверхностного маркера; по оси ординат — количество регистрируемых клеток).

круг эксплантата через 2 недели культивирования была преимущественно занята распластанными клетками веретеновидной формы. При этом клетки культуры МСК из жировой ткани были более распластаны, чем МСК из пульпы зуба (Рис. 1).

Равномерное окрашивание флюорисцентным красителем DAPI ядер клеток как адипогенного происхождения, так и из пульпы зуба не выявляло изменений в структуре хроматина, что указывало об отсутствии апоптоза или изменений функциональной активности ядер.

При проведении проточной цитофлуориметрии были получены данные, свидетельствующие об экспрессии клетками маркеров характерных для МСК: CD44, CD29 и Thy-1 (Таб. 1). При этом экспрессия таких поверхностных антигенов как CD34 и CD45 в клетках, полученных из жировой ткани и пульпы зуба, не была выявлена. Это свидетельствовало об отсутствии примесей крови и лимфоидных клеток в культуре MCK [1].

Полученные результаты подтверждены иммуноцитохимическим методом исследования. Конфокальная микроскопия показала, что клетки, полученные из жировой ткани и пульпы зуба свиней, имеют следующий фенотип: CD44+, CD29+, Thy -1+/CD34-, CD45-(Puc. 2).

Необходимо отметить, что МСК из пульпы зуба свиней экспрессируют CD29 в большей степени, чем МСК из жировой ткани, однако достоверной разницы обнаружено не было. Жизнеспособность МСК, полученных из жировой ткани и пульпы

зуба свиньи, к 3 пассажу составила не менее 96%.

ВЫВОЛЫ

Наше исследование не показало различий в морфофенотипической характеристике МСК, выделенных из жировой ткани и пульпы зуба. Несмотря на то, что скорость первичной экспансии МСК, полученных из пульпы зуба, в первые сутки уступает аналогичному показателю МСК из жировой ткани, эта разница нивелируется к 14-18 суткам инкубации. Доступность жировой ткани и пульпы зуба, а также относительная простота выделения МСК создаёт предпосылки для дальнейшего их исследования с целью применения в клинической практике.

ISOLATION AND CULTIVATION MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE AND TEETH OF PIGS

Timofeeva A.V. - Kazan (Volga region) Federal University, Sergeev M.A. - Candidate of Science, assistant professor, Amirov D.R. - Candidate of Science, assistant professor, Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman.

ABSTRACT

One of the most developing modern areas of regenerative medicine is stem cell therapy. Each such cell is capable of unlimited or partially limited self-renewal and the formation of several types of differentiated healthy offspring. Mesenchymal stem cells (MSCs) are the most suitable for cell therapy. MSCs have the following positive properties that allow these cells to promote axonal regeneration: secretion of various neurotrophic factors and cytokines, the ability to differentiate in various directions, immunomodulatory, anti-inflammatory and antiapoptotic effects. Our studies have shown that primary cultures of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adipose tissue and tooth pulp have similar morphophenotypic characteristics and express MSCs-specific markers CD44, CD29, and Thy-1.

One day after cell culture, the attached cells obtained from adipose tissue had an

elongated shape with several processes, were located singly or in small groups. With further cultivation, these cells began to divide and spread out on the surface of the plastic, increasing in size. The primary culture of MSCs obtained from the tooth pulp began to appear after 5-10 days, migrating from the enzymatically digested tissue attached to the bottom of the tablet. The viability of MSCs obtained from adipose tissue and pulp of a pig's tooth by the 3rd passage was at least 96%.

Taking into account the results obtained in cell culture, it can be expected that when introducing neuronal progenitor cells derived from MSCs into the area of the damaged segment of the spinal cord, they will actively contribute to the regeneration of nervous tissue and the restoration of its functionality.

ЛИТЕРАТУРА

- 1) Лызиков, А.Н. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы / А.Н. Лызиков, Б.Б. Осипов, А.Г. Скуратов, А.А. Призенцов // Проблемы здоровья и экологии. 2015. № 3(45).- С.4-8.
- 2) Пальцева, М.А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии Т. 2 // М.: Медицина, Шико, 2009. 454 с.
- 3) Bartel R. L. Stem Cells and Cell Therapy: Autologous Cell Manufacturing. // Translational Regenerative Medicine.- 2015.- V8.-P.107-120.
- 4) Genetic modification of mesenchymal stem cells in spinalcord injury repair strategies / Cui, X. [et al] // Biosci Trends.- 2013.- V7(5). P.202-208.
- 5) Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects / Marquez-Curtis L.A. [et al] // Cryobiology.- 2015.- V.71(2).-P.181–197.
- 6) Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells. / Cao C. [et al] // Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.- 2005.- V.19(8). P.642-647.