

ОТРИМАННЯ АДГЕЗИВНОЇ ФРАКЦІЇ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЛІНІЙНИХ МИШЕЙ С 57BL/6 ЗА РІЗНИХ УМОВ ВИДІЛЕННЯ ПЕРВИННОГО МАТЕРІАЛУ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ У СЕРЕДОВИЩІ RPMI

А. Й. Мазуркевич, д.вет.н, професор,

Л. В.Кладницька, к.вет.н, доцент,

В. В. Ковпак, к.вет.н, старший викладач.

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м.Київ

*Наведено результати дослідження кількості, життєздатності та проліферативної активності мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) кісткового мозку лінійних мишей С 57BL/6 за різних умов отримання первинного матеріалу та культивування у середовищі RPMI. За показника градієнта щільності фікола 1,074 та 1,076 та параметра центрифугування 300 г встановлена така кількість клітин $6,83 \times 10^5 \pm 0,14 \times 10^{5**}$ та $6,63 \times 10^5 \pm 0,15 \times 10^{5*}$, коефіцієнт проліферації $2,73 \pm 0,06^{**}$ і $2,65 \pm 0,02^*$, життєздатність - $95,06 \pm 1,13^*$, $90,03 \pm 3,09$ відповідно. Підтверджена висока життєздатність - $93,02 \pm 2,30$ за отримання середніх показників численості МСК при культивуванні у середовищі RPMI за умов отримання первинного матеріалу за показника градієнта щільності фікола 1,078 та параметра центрифугування 300 г.*

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, проліферативна активність, життєздатність, коефіцієнт проліферації, миші, культивування.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Мезенхімальні стовбурові клітини вперше були отримані Фріденштейном та співавторами, який описав популяцію фібробластоподібних клітин, виділених з кісткового мозку, здатних диференціюватись в адипоцити, хондроцити, остеоцити та міобласти. Згодом була встановлена можливість диференціювання МСК кісткового мозку в кардіоміоцити, нейрони та астроцити *in vitro* та *in vivo* [1, 2, 3, 4], а також налагоджено отримання МСК з різних тканин, включаючи жиру та м'язову тканину, тканину печінки, плаценту, кордову кров, пульпу зубів [5].

В останні роки застосування МСК з терапевтичною метою привертає значну увагу дослідників у зв'язку з широким спектром захворювань людей і тварин, при лікуванні яких вони можуть бути ефективно застосовані [6].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Відомо, що мононуклеарна фракція складає незначну кількість від усіх клітин кісткового мозку та включає макрофаги, ендотеліальні клітини, лімфоцити, адипоцити. Лише 0,001-0,01 % від кількості мононуклеарних клітин складають мезенхімальні стовбурові клітини. У кістковому мозку МСК знаходяться у неактивній фазі мітозу (G_0), що підтримується взаємодією клітин, а вихід з цього стану та перехід у мітоз забезпечується зміною міжклітинних сигналів. Тому важливо при обробці первинного матеріалу скласти умови для потрапляння у фракцію мононуклеарів кісткового мозку клітин саме у таких кількостях і пропорціях, щоб забезпечити вихід МСК у фазу міотичного ділення, їх адгезію і проліферацію. Кожний вид тварин має свої біологічні особливості, що необхідно враховувати, у тому числі, і з маніпуляціями з первинним матеріалом для отримання адгезивної фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку та подальшого їх культивування [7, 8,

9, 10, 11].

Метою роботи було - визначення умов виділення первинного матеріалу для отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку миші лінії С 57BL/6 з високою проліферативною активністю та культивування у середовищі RPMI.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології тварин НУБіП України.

Усі маніпуляції з отримання первинного матеріалу та культивування МСК здійснювали в стерильному боксі з дотриманням усіх правил асептики й антисептики. Отриманий зі стегнових кісток мишей аспірат кісткового мозку змішували з 0,25 % розчином трипсина 1:3 і залишали за температури 2-4 °С на 12 годин. Трипсинізований кістковий мозок розпіпетовували та фільтрували для видалення клітинних конгломератів. Отриману суспензію клітин центрифугували при 300 г 5 хв. Зливали надосадову рідину, до осаду додавали фосфатно-буферний розчин, розпіпетовували. Отриману суспензію клітин нашаровували на фікол-тріомбраз з різним показником градієнта щільності: дослід 1 - 1,074, дослід 2 - 1,076, дослід 3 - 1,078, дослід 4 - 1,080, та центрифугували при 300 г 25 хв. Після цього відбирали клітинну фракцію на межі фікол-верографіна, додавали фосфатно-буферний розчин, розпіпетовували та осаджували клітини центрифугуванням при 300 г 5 хв. Клітинний осад ресуспендували у культуральному середовищі RPMI та підраховували кількість клітин у камері Горяєва за формулою $X = A \times 1000 / 0,9$, де X – кількість клітин у 1 см^3 досліджуваної суспензії клітин, А – кількість клітин, підрахованих у камері Горяєва; 1000 – кількість мм^3 у 1 см^3 ; 0,9 – об'єм рахункової камери Горяєва, мм^3 . Потім отриману суміш клітин за різних показників градієнта щільності фікол-верографіна культивували *in vitro* в CO_2 -

інкубаторі за температури 37° С та концентрації CO₂ – 5% за абсолютної вологості на культуральному середовищі RPMI (виробництво «Sigma», США) з додаванням 20% FBS (ембріональна сироватка телят) і 10 мкл/см³ – антибіотика-антимікотика. Візуальну оцінку формування моношару здійснювали кожні 24 години за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Carl Zeiss). Остаточний підрахунок кількості клітин, визначення їх життєздатності та коефіцієнта проліферації проводили на момент утворення моношару в одному зі зразків. Контролем слугували стандартні умови отримання первинного матеріалу і культивування клітин, а саме центрифугування первинного матеріалу в фосфатно-буферному розчині без використання фікол-верографіна та культивування – за аналогічних умов із дослідом). Життєздатність визначали використовуючи 0,5 % вітальний барвник трипановий синій. Під впливом барвника мертві клітини фарбуються в темно-синій колір. Життєздатність клітин обчислювали за формулою: $J = \frac{J_{\text{кл}}}{Z_{\text{к-ть кл}}} \times 100$, де J – життєздатність клітин, %, $J_{\text{кл}}$ – кількість живих клітин, підрахованих у камері Горяєва, $Z_{\text{к-ть кл}}$ – загальна кількість клітин, підрахованих у камері Горяєва Одержані результати опрацьовано статистично.

Результати досліджень. Як показали результати досліджень, умови отримання первинного матеріалу з кісткового мозку лінійних мишей C 57BL/6 суттєво впливають на проліферативну активність МСК. При культивуванні у середовищі

RPMI первинного матеріалу, отриманого за показником градієнта щільності фікол-верографіна 1,074 та 1,076 та параметра центрифугування 300 g вже за 24 години культивування була помітна суттєва різниця у прикріпленні МСК до дна культурального посуду у порівнянні зі зразками дослідів 3 і дослідів 4. У зразках дослідів 1 і 2 ми реєстрували прикріплення більшої кількості клітин до дна культурального посуду. На нашу думку це пов'язано із тим, що за вказаних умов отримання у первинний матеріал потрапили клітини в таких пропорціях, що забезпечили швидкий процес адгезії МСК та їх кращу проліферацію.

Найшвидше сформувався моношар клітин у зразку, де використовувався первинний матеріал, отриманий за показника градієнта щільності фікола 1,074. Це засвідчує й найвищий показник кількості клітин у зразку дослідів 1, що становив $6,83 \times 10^5 \pm 0,14 \times 10^5$ (табл.). Показник кількості клітин зразку дослідів 2 також був вірогідно вищим за контроль і становив $6,63 \times 10^5 \pm 0,15 \times 10^5$. Різниця між показниками кількості клітин зразків першої, другої дослідних і контрольної груп була достовірною і становила 29,1 і 11,2 % на користь дослідних зразків відповідно.

За третього і четвертого параметрів центрифугування суспензії клітин кісткового мозку отриманий первинний матеріал не містив тих необхідних пропорцій мононуклеарних клітин, що забезпечують високу проліферативну активність МСК, за що свідчать нижчі від контролю коефіцієнти проліферації, які становлять 5,48 і 4,55 відповідно.

Таблиця

Кількість, проліферативна активність та життєздатність МСК лінійних мишей C57BL/6 за різних умов отримання первинного матеріалу та культивування у середовищі RPMI (n=3, M+m)

Дослід	Показник градієнта щільності фіколверографіна	Кількість клітин x 10 ⁵		
		Кількість клітин x 10 ⁵	Коефіцієнт проліферації	Життєздатність, %
контроль	Контроль	5,29 ±0,27	2,12 ±0,08	91,37±0,40
1	1,074	6,83±0,14**	2,73±0,06*	95,06±1,13*
2	1,076	6,63±0,15*	2,65±0,02	90,03±3,09
3	1,078	5,48±0,09	2,19±0,09	93,02±2,30
4	1,080	4,55±0,16	1,82±0,08	84,37±2,12*

*- P<0,05, ** - P<0,01, *** - P<0,001 порівняно з показниками контрольної групи

При визначенні коефіцієнта кореляції між показниками градієнта густини фікол-верографіна і кількістю клітин, що виростили в моношарі ми отримали $r = -0,97$, що вказує на обернено пропорційну залежність між останніми.

Найвищі показники життєздатності зафіксовано у зразках дослідів 1 і дослідів 3 (див.табл.). Треба відмітити, що максимальні показники життєздатності МСК зафіксовано не тільки за найвищих показників кількості клітин (дослід 1, 2), а також і у досліді 3, де він сягав середніх значень.

Висновки.

1. Проліферативна активність та життєздатність мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку лінійних мишей C 57BL/6 залежить від умов отримання первинного матеріалу.

2. За показника градієнта щільності філол-верографіна 1,074 та 1,076 та параметра центри-

фугування 300 g при отриманні первинного матеріалу з кісткового мозку лінійних мишей C 57BL/6 та подальшого культивування у середовищі RPMI у зразках встановлена така кількість клітин $6,83 \times 10^5 \pm 0,14 \times 10^5$ та $6,63 \times 10^5 \pm 0,15 \times 10^5$, коефіцієнт проліферації $2,73 \pm 0,06$ і $2,65 \pm 0,02$, життєздатність – $95,06 \pm 1,13$, $90,03 \pm 3,09$ відповідно.

3. Підтверджена висока життєздатність МСК $93,02 \pm 2,30$ за середніх показників численості при культивуванні у середовищі RPMI за умов отримання первинного матеріалу з кісткового мозку лінійних мишей C 57BL/6 за показника градієнта щільності фікол-верографіна 1,078 та параметра центрифугування 300 g.

Перспективи подальших досліджень. Врахування біологічних особливостей тварин за умов маніпуляцій з первинним матеріалом дозволяє отримати адгезивні фракції мононуклеар-

Вісник Сумського національного аграрного університету

них клітин кісткового мозку та подальшого їх культивування.

Список використаної літератури:

1. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;249–282.
2. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000;105:1663–1668
3. Jori FP, Napolitano MA, Melone MA, et al. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J Cell Biochem.* 2005;94:645–655.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143–147.
5. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71–74.
6. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 2006;5:91–116.
7. Патент України на корисну модель № 46600, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю / Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Харкевич Ю.О., Сушко М.І. - № у 2009 07829. Заявл.24.07.2009. Опубл. 25.12.2009. Бюл. №24
8. Патент України на корисну модель № 47783, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку котів із високою проліферативною активністю / Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Данілов В.Б., Харкевич Ю.О. - № у 2009 08607. Заявл.14.08.2009. Опубл. 25.02.2010. Бюл. №4
9. Патент України на корисну модель № 47783, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку собак із високою проліферативною активністю / Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Харкевич Ю.О., Сушко М.І. - № у 2009 13880. Заявл.29.12.2009. Опубл. 25.06.2010. Бюл. №12
10. Jiang Y. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. / Y. Jiang, B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes. – *Exp Hematol.* 2002; 30:896–904. doi: 10.1016/S0301-472X(02)00869-X
11. Izadpanah R, Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue/ R. Izadpanah, C. Trygg, B. Patel// *J. Cell Biochem.* 2006; 99:1285–1597. doi: 10.1002/jcb.20904.

Мазуркевич А. Й., Кладницкая Л. В., Ковпак В.В. ПОЛУЧЕНИЕ АДГЕЗИВНОЙ ФРАКЦИИ МОНОКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЛИНЕЙНЫХ МЫШЕЙ С 57BL/6 ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОГО МАТЕРИАЛА И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В СРЕДЕ RPMI

Представлены результаты исследования количества, пролиферативной активности и жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток костного мозга линейных мышей C57BL/6 при различных условиях получения первичного материала и культивирования в среде RPMI. При показателях градиента плотности фиколл-верографина 1,074 и 1,076 и параметра центрифугирования 300 г установлено следующее количество клеток $6,83 \times 10^5 \pm 0,14 \times 10^{5**}$ та $6,63 \times 10^5 \pm 0,15 \times 10^5^*$, коэффициент пролиферации $2,73 \pm 0,06^{**}$ і $2,65 \pm 0,02^*$, жизнеспособность – $95,06 \pm 1,13^*$, $90,03 \pm 3,09$ соответственно. Подтверждена высокая жизнеспособность – $93,02 \pm 2,30$ при средних показателях количества МСК при культивировании в среде RPMI при получении первичного материала при показателях градиента плотности фиколл-верографина 1,078 и параметрах центрифугирования 300 г.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, пролиферативная активность, жизнеспособность, коэффициент пролиферации, мыши, культивирование

Mazurkiewicz A.I., Kladnytskaya L.V., Kovpak V.V. GETTING THE ADHEZYVE FRACTION OF MONONUCLEAR BONE MARROW CELLS LINE OF MICE C 57BL/6 IN DIFFERENT CONDITIONS OF PRIMARY MATERIAL AND CULTIVATIONS IN RPMI MEDIA.

The results of the study quantity, viability and proliferative activity of mesenchymal stem cells from bone marrow of mice of line C 57BL/6 under different conditions obtaining primary material and cultivation in RPMI medium are presents in this article. For fikoll density gradient index 1,074 and 1,076 and 300 g centrifugation parameter we are calculated the following number of cells $6,83 \times 10^5 \pm 0,14 \times 10^{5**}$ and $6,63 \times 10^5 \pm 0,15 \times 10^5^*$, proliferation rate $2,73 \pm 0,06^{**}$ and $2,65 \pm 0,02^*$, vitality $95,06 \pm 1,13^*$, $90,03 \pm 3,09$ severally. It was confirmed high viability – $93,02 \pm 2,30$ to obtain the average number of MSCs under conditions of a primary material for fikoll density gradient index 1,078 and centrifugation parameter 300 g.

Key words: mesenchymal stem cells, proliferative activity, viability, proliferation rate, mouse, cultivation

Рецензент: д.вет.н., професор Камбур М.Д.

Дата надходження до редакції: 02.01. 2014 р.