РОЗДІЛ 7. ВНУТРІШНІ НЕЗАРАЗНІ ХВОРОБИ ТА КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ

УДК 619:611.018:636.7

ОСТЕОГЕННА ТА АДИПОГЕННА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН СОБАК

Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Харкевич Ю.О.
Національний університет біоресурсів і природокористування України,
м. Київ, Україна, e-mail: amaz@naiu.kiev.ua

Отримані результати успішної диференціації мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) кісткового мозку собаки in vitro в остеогенному та адипогенному напрямах. Встановлено, що у клітин в процесі диференціації знижуються адгезивні властивості, втрачається характерна їм веретеноподібна форма, – вони стають полігональними. Під час культивування клітин у індукційному остеогенному середовищі в їх цитоплазмі різко збільшується активність ендогенної лужної фосфатази, а у позаклітинному матриксі відкладаються солі кальцію. За диференціювання клітин в адипогенному напрямі в цитоплазмі останніх формуються вакуолі, які при фарбуванні ліпофільним барвником Oil Red O виявляють акумуляцію нейтральних жирів.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, диференціювання, кістковий мозок, лужна фосфатаза, солі кальцію, нейтральні жири.

Протягом життя в організмі тварини постійно проходять процеси загибелі клітин тканин. Підтримання необхідної кількості клітин при цьому відбувається як за рахунок проліферації тканинноспецифічної популяції прогеніторних клітин відповідних органів, так і популяції недиференційованих стовбурових клітин [6]. Заміщення не функціонуючих клітин здійснюється завдяки здатності стовбурових клітин за певних умов диференціюватися у різні типи клітин (ортодоксальний та неортодоксальний напрями). Умови, які впливають на диференціювання клітин, залежать від мікрооточення цих клітин, зокрема вмісту в міжклітинній речовині певних біологічно активних речовин (факторів росту, гормонів тощо), які синтезуються іншими клітинами.

Серед домашніх тварин, собаки займають провідне місце при застосуванні стовбурових клітин з терапевтичною метою, особливо за патології опорно-рухового апарату. Насамперед це пов'язано клінічним ефектом при застосуванні стовбурових клітин і невеликими затратами на відбір кісткового мозку – основного джерела стовбурових клітин та нарощування біомаси цих клітин. Вже на сьогодні розроблена та достатньо апробована методика отримання кісткового мозку собак з губчастої кісткової тканини трубчастих кісток[1].

Оскільки клітинно-заміщуюча терапія при лікуванні собак на сьогодні є актуальною, то дослідження здатності стовбурових клітин даного виду тварин до диференціювання in vitro у ортодоксальному напрямі являється актуальним завданням. Це дозволяє не лише підтвердити їх мультипотентні властивості, а й свідчить про правильне використання методичних підходів під час виділення та культивування цих клітин на ранніх пасажах і збереження їх мультипотентних властивостей.

З огляду на це, метою нашої роботи було дослідити in vitro здатність мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собаки диференціюватися у остеогенному та адипогенному напрямах.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведені із мезенхімальними стовбуровими клітинами, отриманими із губчастої кісткової тканини безпородного пса, на другому і третьому пасажі їх культивування.

Мезенхімальні стовбурові клітини культивували в середовищі Ігла, модифікованому Дюльбекко (DMEM), доповненому 20 % ембріональної сироватки теляти (FBS) та 10 мкл/см^3 антибіотика-антимікотика. На другому пасажі культивування після заповнення дна культурального посуду клітинами на 60–80 % стандартне поживне середовище видаляли та замінювали на індукційне, у якому клітини культивували впродовж 2–3 тижнів. Для направленої диференціації мезенхімальних стовбурових клітин в остеогенному напрямі використовували культуральне середовище наступного складу: DMEM – 90 %, FBS – 10 %, аскорбінова кислота – 50 мкг/мл поживного середовища, ß-гліцерофосфат – 5 мМ/мл поживного середовища, дексаметазон – 10^{-8} М/мл поживного середовища, антибіотик-антимікотик – 10 мкл/мл поживного середовища; у адипогенному напрямі – DMEM – 90 %, FBS – 10 %, дексаметазон – 10 μМ/мл поживного середовища, індометацин – 60 μМ/мл поживного середовища, 3-ізобутил-1-метилксантин – 500 μМ/мл, інсулін – 10 мкг/мл поживного середовища, антибіотик-антимікотик – 10 мкл/мл поживного середовища. Заміну індукційного середовища здійснювали кожних 3 доби [7].

Процес диференціювання клітин у остеогенному напрямі контролювали шляхом визначення у клітинах активності ендогенної лужної фосфатази, яка бере безпосередню участь у процесі остеогенезу, за Kaplow (табл. 1) та відкладання солей кальцію [5]. Активність ендогенної лужної фосфатази визначали у моношарі клітин, які попередньо фіксували у розчині цитрат-ацетону-

формальдегіду впродовж 30 с., після цього промивали деіонізованою водою впродовж 40 секунд. Потім клітини фарбували впродовж 15 хвилин у суміші naphtolas-bialkaline solution, FRV-alkaline solution, sodium nitrate solution та деіонізованої води і знову промивали деіонізованою водою впродовж 2 хв. Не доводячи до висихання, клітини контрфарбували гематоксиліном. Мікроскопію проводили за збільшення у 200 разів. За наявності ферменту лужної фосфатази цитоплазма клітини забарвлювалася у рожевий колір [5].

Для виявлення відкладень солей кальцію з культури клітин видаляли культуральне середовище. Клітинний моношар промивали двічі деіонізованою водою. Клітини фіксували у розчині цитрат-ацетону-формальдегіду протягом 2 хв. за кімнатної температури, після чого промивали двічі деіонізованою водою. На препарат наносили 1 %-й водний розчин алізаринового червоного та витримували протягом 2 хв. Клітини промивали двічі деіонізованою водою. Мікроскопію здійснювали при збільшенні у 200 разів. При цьому поля мінералізації зафарбовувалися у помаранчево-червоний колір [4].

Таблиця 1 – Показники активності ендогенної лужної фосфатази за Kaplow

Ступінь активності ендогенної лужної фосфатази	Кількість забарвлених клітин, %	Розмір гранул	Інтенсивність зафарбовування гранул	Фон цитоплазми
0	–	–	–	–
1+	50	Дрібн	Слабка, помірна	Безколірна, блідорожева або блідоблакитна
2+	50–80	Дрібні	Помірна, сильна	Блідорожева або блідоблакитна
3+	80–100	Середні, великі	Сильна	Рожева або блакитна
4+	100	Середні, великі	Яскрава	Невидима

Процес диференціювання клітин у адипогенному напрямі контролювали шляхом визначення у клітинах включень нейтрального жиру за фарбування ліпофільним барвником Oil Red O [7]. При цьому клітинний моношар промивали фосфатно-буферним розчином та фіксували впродовж 15 хв. за допомогою 4 % розчину параформальдегіду. Клітини двічі промивали деіонізованою водою та впродовж 15 хв. фарбували робочим розчином барвника Oil Red O. Барвник зливали, а моношар клітин знову промивали деіонізованою водою до повного її просвітління. За допомогою світлової мікроскопії при збільшенні у 200 разів виявляли пофарбовані ліпід у вигляді червоних вкраплень.

Результати досліджень. Як свідчать результати досліджень, вже на четверту добу після індукції направленої диференціації мезенхімальних стовбурових клітин собаки у остеогенному напрямі у них було відмічено високий рівень активності лужної фосфатази – 3+, що свідчить про активізацію процесу остеогенезу. Даний фермент мав форму досить великих гранул та локалізувався у цитоплазмі клітин (рис. 1).

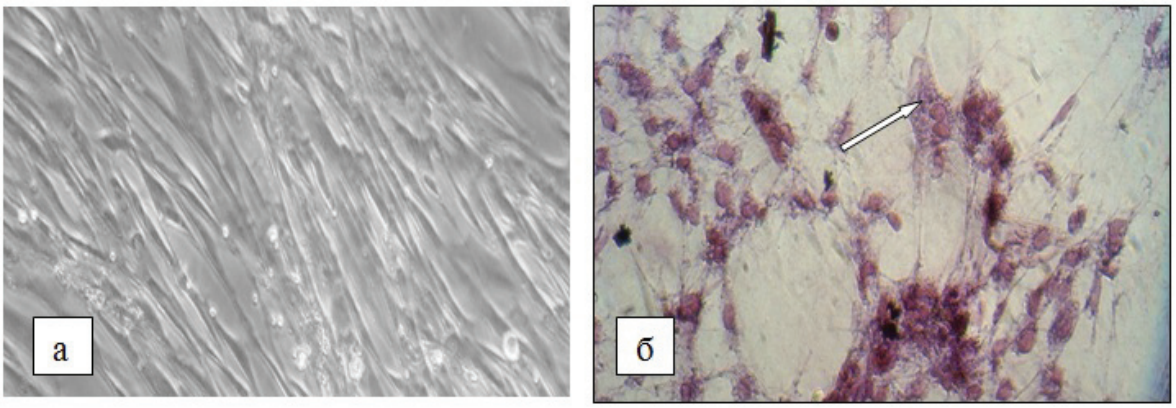

Рис. 1. Направлена диференціація мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собаки в остеогенному напрямку: а – контрольна культура клітин; б – гранулярний тип ендогенної лужної фосфатази мезенхімальних стовбурових клітин собаки, х 200. Стрілкою позначені гранули лужної фосфатази в цитоплазмі клітини

Важливою ознакою остеогенної диференціації також є інтенсивність відкладання солей кальцію в місцях активного функціонування остеогенних клітин [2, 3]. Цьому процесу передує синтез остеобластами ферменту лужної фосфатази, яка розщеплює гліцерофосфати на вуглеводні сполуки та фосфорну кислоту. Остання вступає в реакцію з солями кальцію, які осідають в основній речовині у вигляді сполук кальцію, що формують аморфні відкладення $Ca_3(PO_4)_2$, які в подальшому перетворюються на кристали гідроксиапатиту $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

У наших дослідженнях на 14 добу культивування у моношарі мезенхімальних стовбурових клітин були виявлені локуси мінералізації, що підтверджується гістохімічним дослідженням на виявлення солей кальцію. Локуси мінералізації являли собою

невеликі частинки позаклітинного матриксу, забарвлені в червоний колір (рис. 2). При дослідженні активності лужної фосфатази та інтенсивності відкладання солей кальцію контрольним зразком слугував моношар мезенхімальних стовбурових клітин тварин без індукції в остеогенному напрямку.

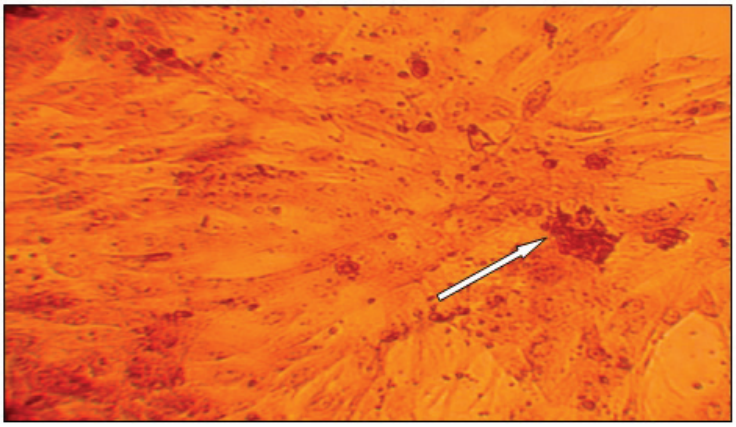

Рис. 2. Позаклітинні кристали кальцію у моношарі мезенхімальних стовбурових клітин собаки. Фарбування алізариновим червоним, х 200. Стрілкою показано локус мінералізації

У процесі індукції диференціювання МСК в остеогенному напрямі клітини змінюють форму від веретеноподібної до полігональної. Окремі клітини відкріплювалися від субстрату та потрапляли у товщу середовища, що, очевидно, можна пояснити зниженням їх адгезивних властивостей.

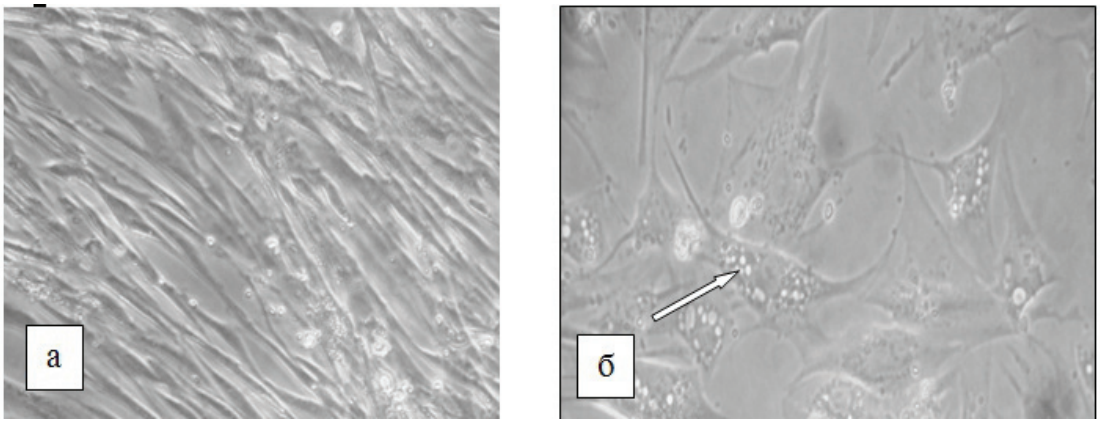

Рис. 3. МСК КМ собаки на II пасажі диференційована в адіпогенному напрямку а – клітини контрольної групи (жива, незабарвлена культура клітин, яка не диференціювалась у адіпогенному намрямку); б – клітини дослідної групи (жива, незабарвлена культура клітин, яка піддалась диференціюванню у адіпогенному напрямку), х 200

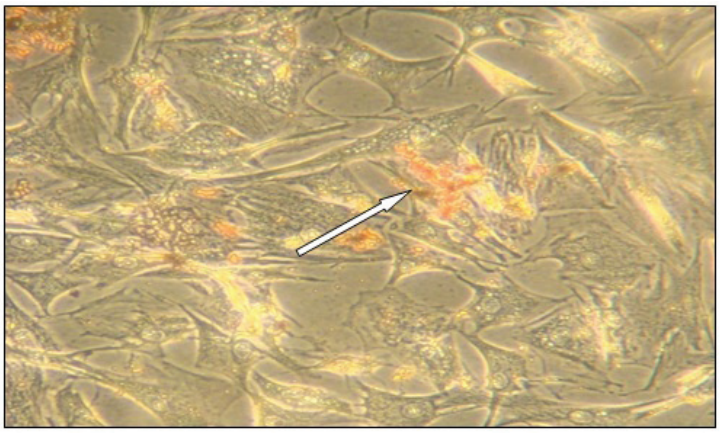

Рис. 4. Внутрішньоклітинні вакуолі (показано стрілкою) мезенхімальних стовбурових клітин собаки, які містять нейтральні жири. Фарбування барвником Oil Red O, х 200.

Як свідчать результати досліджень направленої диференціації мезенхімальних стовбурових клітин в адипогенному напрямі, починаючи з 10-ої доби експерименту у цитоплазмі клітин формуються вакуолі, які у світловому мікроскопі мають вигляд дрібних включень овальної форми, що пропускають промені світла. У процесі диференціації вакуолі дещо збільшуються в розмірах та набувають більш округлого вигляду (рис. 3).

На 21 добу експерименту в сформованих внутрішньоклітинних вакуолях стовбурових клітин поступово накопичувались нейтральні жири, які виявляли шляхом фарбування моношару цих клітин ліпофільним барвником Oil Red O (рис. 4).

При цьому, як і у випадку диференціації в остеогенному напрямі, окремі клітини відкріплювалися від субстрату та потрапляли у товщу середовища. В процесі диференціації клітини також втрачали властиву їм веретеноподібну форму.

Висновки. 1. Спрямована диференціація мезенхімальних стовбурових клітин собак в остеогенному напрямі відбувається після додавання до культурального середовища дексаметазону (10^{-8} М/мл), ß-гліцерофосфату (5 мМ/мл) та аскорбінової кислоти (50 мкг/мл), що підтверджується зміною морфології клітин, зниженням їх адгезивних властивостей, а також високою активністю у цитоплазмі клітин ендогенної лужної фосфатази та відкладанням у міжклітинному матриксі солей кальцію.

2. Додавання до культурального середовища дексаметазону (10 μМ/мл), індометацину (60 μМ/мл), 3-ізобутил-1-метилксантину (500 μМ/мл) та інсуліну (10 мкг/мл) викликає спрямовану диференціацію мезенхімальних стовбурових клітин собак в адипогенному напрямі, що підтверджується зміною морфології клітин, зниженням їх адгезивних властивостей, а також появою у цитоплазмі клітин вакуолей, які містять нейтральні жири.

3. Здатність мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собак до направленої диференціації в остеогенному та адипогенному напрямах є підтвердженням їх мультипотентних властивостей.

Список літератури

1. Мазуркевич А.Й. До методики отримання кісткового мозку у собак / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, С. М. Ткаченко, Ю. О. Харкевич // Біологія тварин. – 2014. Т. 16. N2. – С. 66 – 70.
2. Фриденштейн А.Я. Пролиферативные и дифференцировочные потенции с клетогенных костномозговых колониеобразующих клеток / А.Я. Фриденштейн, Р.К. Чайлахян, Ю.В. Герасимов // Цитология. (1986. (№28 (3). (С.341(349.
3. Burch W.M. Phosphotyrosine and phosphoprotein phosphatase activity of alkaline phosphatase in mineralizing cartilage/ W.M. Burch, L. Hammer, R.S. Wuthier//Metabolism.(1985.(Vol.34, №2. (P.169(175.
4. FreshneyR.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique.(U.K.: Wiley Liss, 2005.(642 p.
5. Kaplow L. S. A histochemical procedure for localizing and avalueting leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow / L. S. Kaplow // Blood − 1955. − Vol.10. − P. 1023.
6. Presnell S. Stem cells in adult tissue/ S. Presnell, B. Petersen, M.Heidaron // Develop. Biol. −2002. −Vol.13. −P.369−376.
7. Vieira N.M. Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells / N.M. Vieira, V. Brandalise, E.Zucconi et al. //Cell Transplantation. − 2010. −Vol.19. −P.279–289.

OSTEOGENIC AND ADIPOGENIC DIFFERENTIATIONT OF MESENCHYMAL STEM CELLS OF DOGS

Mazurkevych A.I., Maliuk M.O., Kovpak V.V., Kharkevych Y.O.
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiyv, Ukraine

The results of in vitro studies of the ability of bone marrow derived mesenchymal stem cells of dogs to differentiate into osteogenic and adipogenic directions are presented. Was found that during the process of differentiation cells loses their adhesive properties and characteristic spindle-shaped appearance and became polygonal. Cells which were cultured in osteogenic medium had dramatically increased level of endogenous alkaline phosphatase activity in the cytoplasm. Deposits of calcium salts in the extracellular matrix was also found. In the cytoplasm of cells which were subjected to differentiation into adipogenic direction formation of vacuoles which contains of neutral fats was revealed. Confirmation of neutral fats accumulation was verified by lipophilic dye Oil Red O.

Keywords: mesenchymal stem cells, to differentiate, dogs.