

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ХОНДРОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПОЛИМЕРНОМ АЛЬГИНАТНОМ МАТРИКСЕ

Ермоленко Е.М. Чуксин В.П.*

*УО «Белорусский государственный медицинский университет» кафедра
биоорганической химии, НИЧ лаборатория биохимических методов
исследования*

*УЗ «6 городская клиническая больница, Городской клинический центр
травматологии и ортопедии», НИЧ лаборатория биохимических методов
исследования**

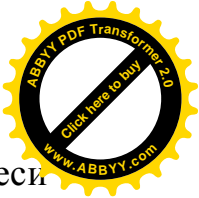
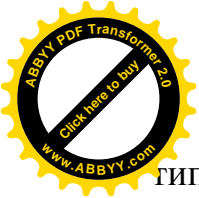
Актуальность. Благодаря развитию новых уникальных технологий в настоящее время разрабатываются биосовместимые конструкции из биомедицинских материалов, применяющиеся для замены или укрепления пораженных или изношенных органов и тканей. Одна из ключевых проблем данного наукоемкого направления – создание экологически чистых материалов с максимально полезными свойствами. Используемый в клеточной и тканевой инженерии междисциплинарный подход направлен в первую очередь на создание новых биоконпозиционных материалов для восстановления утраченных функций отдельных тканей или органов в целом. Использование природных биополимеров в создании биоинженерных каркасов позволяет максимально имитировать тканевое строение и создавать микроокружение со структурой, близкой к строению природных клеточных ниш.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) считаются хорошим материалом для тканевой инженерии хряща поскольку они легко доступны, способны к быстрому размножению и мультипотентны. Дифференцировка МСК в хондроциты – путь к успешной регенерации хрящевой ткани.

В последние годы резко возрос интерес к альгинатам как к материалу для трехмерного культивирования МСК. Это связано с тем, что альгинат является природным биосовместимым полимером, отвечающим всем требованиям предъявляемым матриксу для инсталляции клеток и последующей трансплантации (1,2). Изучению данной проблемы и была посвящена данная работа.

Цель исследования – изучить особенности инсталляции, культивирования и хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в полимерном матриксе для получения хрящевых структур.

Материалы и методы. Выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани. Липоаспират тщательно отмывали раствором фосфатного буфера, после чего подвергали ферментации 0,075% раствором коллагеназы I



типа в течение 30-60 мин. Для нейтрализации фермента добавляли к смеси равный объем фосфатного буфера с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Отмывали полученную клеточную суспензию. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в полной питательной среде α -MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone) до достижения количества 5 млн.кл. Все манипуляции проводили в стерильных условиях.

Приготовление альгинатных матриц. Для приготовления альгинатного раствора соль (w/o) (low viscosity, Sigma) растворяли в физиологическом растворе на водяной бане. Для полимеризации раствора альгината натрия отработывали растворы, содержащие разные концентрации ионов кальция.

Оценка жизнеспособности инсталлированных в матричный носитель МСК ЖТ. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью окрашивания и подсчета клеток в 0,1 % растворе трипанового синего. Количество клеток и жизнеспособность оценивали в камере Горяева.

Хондрогенная дифференцировка инсталлированных в матричный носитель МСК ЖТ. Для хондрогенной дифференцировки клеток культивируемых в альгинатном носителе, матрикс с клетками помещали в дифференцировочную среду содержащую: DMEM /F12, FBS, ITS (инсулин-трансферин -селеновая добавка), раствор антибиотиков, L-глутамин, рекомбинантный человеческий TGF- β 3, L-аскорбат-2-фосфат, дексаметазон, L-пролин, пируват натрия.

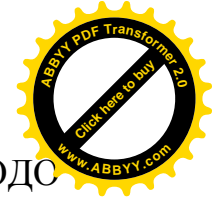
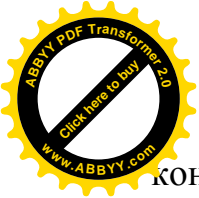
Молекулярно-биологические исследования. Молекулярно-биологические исследования. Для качественного выделения РНК из свежих, незамороженных клеток был использован реактив фирмы Qiagen - RNeasy Protect Cell Reagent.

Из хрящевой и костной ткани (не более 20 мг) РНК выделяли после растирания ткани с жидким азотом до состояния пудры. Использовали набор реактивов для выделения РНК – innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena AG). Все манипуляции проводили согласно инструкции производителя.

Проведения ОТ-ПЦР осуществляли при помощи набора реактивов RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit согласно рекомендациям фирмы-производителя Fermentas.

Все полученные образцы РНК (кДНК) проверяли на экспрессию одного из генов «домашнего хозяйства» (housekeeping gene) – GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа), что и явилось контролем прохождения реакции ОТ.

После того как обратная транскрипция закончена и образована cDNA на матрице мРНК, проводили ПЦР с применением PCR Master Mix (2x) фирмы Fermentas и специфических праймеров для каждого гена соответственно в



конечном объеме 30 мкл. Олигонуклеотиды были синтезированы ОДС «Праймтех».

Последовательности праймеров указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Перечень генов хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека

Название гена	Нуклеотидная последовательность
COL2A1 (Collagen II)	F 5'-GGCAATAGCAGGTTACGTACA-3' R 5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACTT-3'3'
ACAN (aggrecan)	F 5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3' R 5'-TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA-3'
COMP (Cartilage oligomeric matrix protein)	F 5'-CCGACAGCAACGTGGTCTT-3' R 5'-CAGGTTGGCCCAGATGATG-3'
SOX9 SRX (sex determining region Y)-box 9	F 5'-GACTTCCGCGACGTGGAC-3' R 5'-GTTGGGCGGCAGGTACTG-3'

Продукты амплификации разделяли электрофоретически. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе. Контроль длин продуктов амплификации проводили на основании соответствия ДНК-маркерам («Fermentas», Литва).

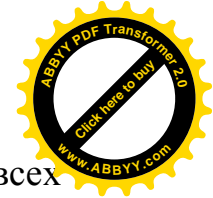
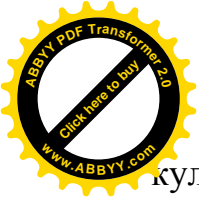
Для ПЦР в реальном времени использовали те же праймеры. Количественное RT PCR проводили с использованием интеркалирующего красителя SYBRGREEN на амплификаторе (ДТ 322 ДНК Технология, Россия) согласно инструкции к комплекту реагентов qPCR GreenMaster with UNG\ROX (Jena Bioscience). Нормализация экспрессии искомым генов определялась по экспрессии генов GPDH, ВАК.

Проточная цитофлуориметрия. Исследование выполняли с использованием лазерного проточного цитофлуориметра Epics Altra (Швейцария). Клетки были сняты с культуральных флаконов 0.25% трипсином с ЭДТА. Клетки промывали в буфере для проточной цитофлуориметрии (ФСБ, 2% FBS, 0,2% Tween 20), затем инкубировали в течение 30 минут в буферном растворе для проточной цитофлуориметрии с добавлением FITC-конъюгированных к следующим CD-маркерам: 29, 44, 90, и TRITC-конъюгированных моноклональных антител к CD 105 (Beckman Coulter).

Результаты и их обсуждение.

Морфологический анализ культуры МСК ЖТ, инсталлированной в разные экспериментальные модели альгинатных матричных носителей.

Для исследования были использованы матрицы, приготовленные на основе 2% альгината натрия, растворенного в 0,9% NaCl и ростовой питательной среде DMEM\F12, в которые были инсталлированы МСК. Матрицы с клетками помещали в полную питательную среду. Морфологический анализ клеток проводился в течение всего периода



культивирования (14 суток). На первые сутки культивирования во всех образцах клетки равномерно распределялись в объеме матриц и имели сферическую морфологию. Начиная с 3 суток культивирования, происходило изменение морфологии клеток: одновременно с округлыми клетками наблюдались вытянутые веретенообразные клетки фибробласто-подобной морфологии. Клетки распределялись неравномерно, слоями, группами и образовывали небольшие скопления.

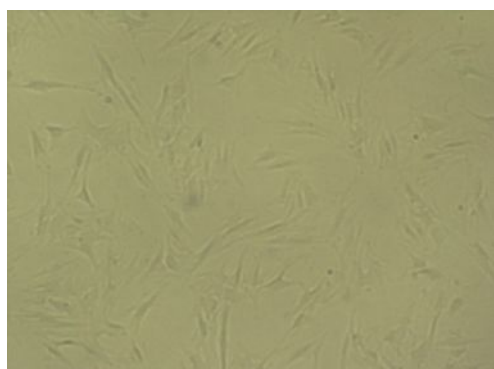
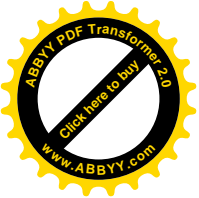
Жизнеспособность клеток зависела от концентрации хлорида кальция. При 100 мМоль на 3 суток культивирования ЖСП составляла 79%. В процессе культивирования она еще снижалась: на 5 суток – 77%, на 8 сутки- 75%, на 14 суток – 70%. При использовании для полимеризации геля 50 мМ раствора CaCl_2 жизнеспособность клеток составляла 90-95% на всех временных отрезках культивирования. Аналогичные результаты получены и для геля, полимеризованного 25 мМ раствором CaCl_2 , однако гель оказался очень жидким и при смене ростовой среды происходила потеря клеток.

Таким образом, оптимальными оказались модели из 2% альгината натрия, полимеризованные 50 мМ раствором хлорида кальция.

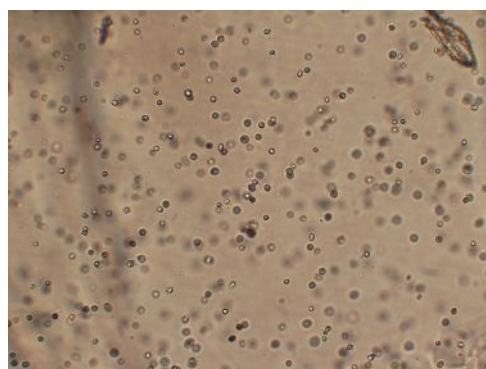
Сравнительный анализ морфофункциональных характеристик 3D и 2D клеточных культур.

Для исследования были использованы матрицы, приготовленные на основе 2% альгината натрия, растворенного в 0,9% NaCl, в который были инсталлированы МСК. Для контроля использовали МСК ККМ, культивированные в обычных условиях на пластике.

Матрицы с клетками помещали в полную питательную среду. Сравнительный морфологический анализ клеток проводился в течение всего периода культивирования (14 суток). В течение первых суток культивирования в трехмерной структуре клетки располагались поодиночке и имели сферическую морфологию (рисунок 1). Начиная со 2-х суток культивирования, происходили изменения морфологии клеток в экспериментальных образцах: одновременно с округлыми клетками наблюдались вытянутые веретенообразные клетки фибробластоподобной формы. В контрольных образцах клетки имели обычную веретенообразную морфологию, монослой достигал 60 % конфлюэнтности. На 4-е сутки культивирования клетки в объеме матрикса были распространены неравномерно, располагались слоями, группами, образовывали небольшие скопления. Контрольные образцы достигли 80 % конфлюэнтности монослоя. К 6-м суткам весь объем матрикса был заполнен клетками, которые располагались слоями. Контрольные образцы достигли 100% конфлюэнтности монослоя.



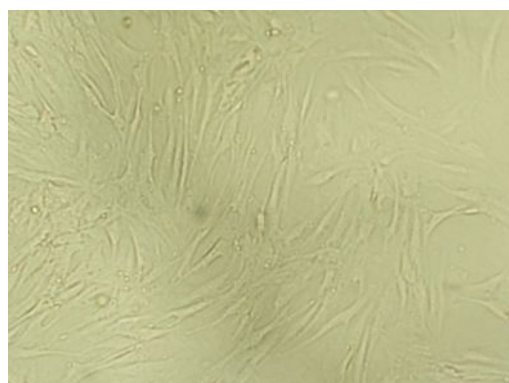
A



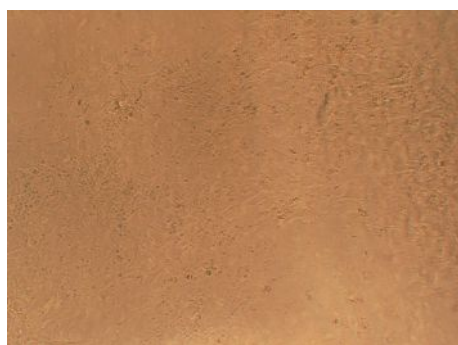
B



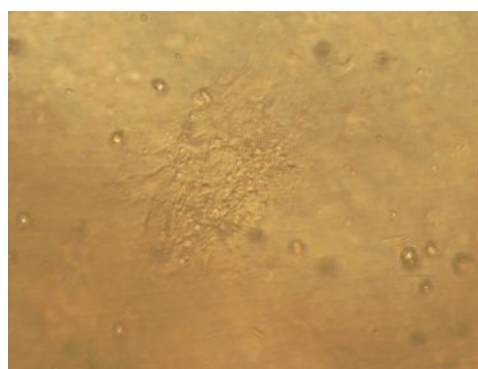
C



D



E



F

Рисунок 1 – Культуры МСК в альгинатном геле и культуральном пластике.

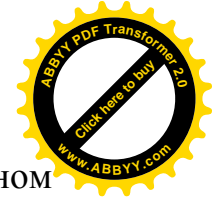
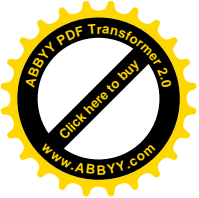
A – 1-е сутки культивирования МСК на культуральном пластике, 10х

B – 1-е сутки культивирования МСК в альгинатном геле приготовленном на 0,9% NaCl, 50mM CaCl₂, 10х

C – 3-е сутки культивирования МСК в альгинатном геле, приготовленном на 0,9% NaCl, 50mM CaCl₂, 40х

D – 3-е сутки культивирования МСК на культуральном пластике, 10х

E – 6-е сутки культивирования МСК в альгинатном геле, приготовленном на 0,9% NaCl, 50mM CaCl₂, 10х



F – 3-е сутки культивирования МСК в альгинатном геле приготовленном на 0.9% NaCl, 50mM CaCl₂, 40x

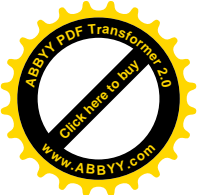
Для оценки жизнеспособности на 6-е сутки альгинатный матрикс был деполимеризован цитратом натрия. После трехкратной отмывки клетки окрашивали 4% раствором трипаново синего и подсчитывали процент жизнеспособных клеток по сравнению с контролем. Так, контрольные (2D) образцы показали 99,9% ЖСК, в то время как опытные (инсталлированные в альгинатный носитель) 90-95%, что повторяет результаты, полученные в предыдущих исследованиях. Небольшое снижение ЖСК в опытных образцах может быть связано как с токсичностью раствора 50mM CaCl₂, так и с многократными отмывками опытных клеток.

Для сравнения пролиферативной активности контрольные (2D) и опытные (3D) образцы высевали в одинаковом количестве. По достижении монослойной культурой конfluence (6 сутки) клетки снимали с помощью трипсина и подсчитывали их количество в камере Горяева. Одновременно извлекали клетки из альгината путем деполимеризации и подсчитывали их количество по сравнению с монослойной культурой. В ходе эксперимента оказалось, что пролиферативная активность клеток в условиях трехмерной структуры снижена на 15% по сравнению с контролем (n=12, где n – количество контрольных и экспериментальных чашек).

Так же сравнивался фенотип контрольных (2D) и опытных (3D) образцов. Все образцы были проинкубированы с антителами к CD44, CD29, CD90 и CD105. При 2D культивировании количество МСК ЖТ позитивных по CD44 составляло $98,9 \pm 1,0\%$, по CD90 – $89,7 \pm 1,0\%$, по CD105 – $88,1 \pm 1,3\%$. Большинство клеток ($99,1 \pm 0,9\%$) окрашивалось с помощью FITC-меченых антител к CD29, что свидетельствует об их принадлежности к мезенхимальным стволовым клеткам. В ходе эксперимента было установлено, что МСК, культивируемые в трехмерной среде показали сходные данные по анализу фенотипа. Так, в 3D культуре количество клеток, позитивных по CD44 составляло $98,7 \pm 1,1\%$, по CD90 – $89,2 \pm 1,0\%$, по CD105 – $87,7 \pm 1,2\%$, CD 29 – $98,6 \pm 1,2\%$.

Хондрогенная дифференцировка МСК ЖТ в полимерном матриксе.

Хондрогенная дифференцировка инсталлированных в матриксный носитель клеток проводилась в дифференцировочной среде содержащей: DMEM /F12, FBS, ITS (инсулин-трансферин -селеновая добавка), раствор антибиотиков, L-глутамин, рекомбинантный человеческий TGF-b3, L-аскорбат-2-фосфат, дексаметазон, L-пролин, пируват натрия.



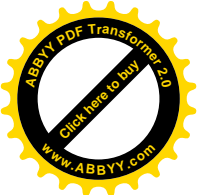
Для отрицательного контроля использовали мезенхимальные стволовые клетки, культивируемые в полной питательной среде без дифференцировочных факторов. Для положительного контроля использовали 2D культуру клеток, культивируемую в дифференцировочной среде и биоптаты хрящевой ткани. Экспериментальные образцы клеток инсталлировали в альгинатный матрикс после чего культивировали в течение 12 дней в дифференцировочной среде.

В течение 12 дней проводилась морфологическая оценка экспериментальных и контрольных групп. В группе отрицательного контроля морфологических изменений не наблюдалось. Клетки имели характерную фибробласто-подобную морфологию. В группе положительного контроля клетки приобретали округлую форму и на 12 сутки окрашивались альциановым голубым красителем и сафранином O, что указывает на хондрогенез МСК. Однако объективно визуализировать происходящие в процессе дифференцировки в экспериментальных (3D) культурах изменения в морфологии клеток оказалось проблематично из-за искажения изображения клеток в альгинатном матриксе. В связи с этим, проводили ПЦР для оценки эффективности хондрогенной дифференцировки контрольные и опытные образцы исследовали на наличие экспрессии генетических маркеров хондрогенеза – агреккана, коллагена и Sox 9.

Результаты анализа показали, что экспрессия агреккана, коллагена II и Sox 9 наблюдалась уже после 3-х суток культивирования клеток в дифференциальной среде и продолжалась весь период наблюдения до 12 суток. Так же экспрессия генов, указывающих на дифференцировку была подтверждена при помощи относительного количественного ПЦР в реальном времени. Полученные результаты согласуются с исследованиями для монослойных культур. Таким образом, можно говорить о том, что полимерный матрикс на основе альгината не оказывает влияние на дифференцировочный потенциал МСК.

Выводы: 1. Было установлено, что жизнеспособность клеток при культивировании в альгинатном матриксе зависит от концентрации хлорида кальция, вносимого для полимеризации геля, и длительности культивирования: оптимальными оказались модели из 2% альгината натрия, полимеризованные 50 мМ раствором хлорида кальция.

2. Хондрогенная дифференцировка МСК ЖТ в полимерном матриксе была выявлена при помощи сравнительного анализа экспрессии генетических маркеров – агреккана, коллагена и Sox 9. Так же экспрессия генов, указывающих на дифференцировку была подтверждена при помощи относительного количественного ПЦР в реальном времени.



3. При сравнении 2D и 3D клеточных культур было обнаружено, что пролиферативный потенциал монослойной культуры на 15% выше, чем клеток, культивируемых в альгинатном матриксе.

4. Сравнительный анализ CD маркеров МСК не выявил достоверных отличий между клетками культивируемыми в разных условиях.

Список литературы:

1. Augst A.D., Kong H.J., Mooney D.J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci.* 2006; 6: 623–633.
2. PW Dettmar, V. Strugala and JC Richardson, The key role alginates play in health, *Food Hydrocoll.* **25** (2011) 263-266.