

УДК: 57.085.23

НАПРАВЛЕННЫЙ ХОНДРОГЕЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В 3D СРЕДЕ.

Ермоленко Е.М.

Научные руководители: д.м.н, профессор Потапнев М.П, к.б.н Ибрагимова Ж.А,
Марчук С.И

Учреждение образования

«Белорусский государственный медицинский университет»

Республика Беларусь, г Минск

Введение. 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 этой проблемы и была посвящена данная работа.

Цель исследования. Изучить особенности 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 матриксов. Для приготовления альгинатного раствора соль (в/о) (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 матриксный носитель МСК ЖТ (мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани). 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 матриксный 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-b3, 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 (полимеразная цепная реакция обратная транскрипция) 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 ОДО «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'-TCGAGGGTGTAGCGTAGAGA-3'
COMP (Cartilage oligomeric matrix protein)	F 5'-CCGACAGCAACGTGGTCTT-3' R 5'-CAGGTTGGCCAGATGATG-3'
SOX9 SRY (sex determining region Y)-box 9	F 5'-GACTTCCGCGACGTGGAC-3' R 5'-GTTGGGCGGCAGGTA CTG-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, BAK.

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.

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- β 3, 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:

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.

ЛИТЕРАТУРА

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