© Коллектив авторов, 2019
УДК 57.085.23
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14015>
ISSN – 2073-8137

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС ДЛЯ РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИКСОВ

Е. В. Кувда, Е. А. Губарева, И. С. Гуменюк, Р. З. Накохов, Д. П. Пузанов

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

BONE MARROW AND ADIPOSE-DERIVED RAT MESENCHYMAL STEM CELLS FOR RECELLULARIZATION OF BIOLOGICAL MATRICES

Kuevda E. V., Gubareva E. A., Gumenyuk I. S., Nakokhov R. Z., Puzanov D. P.

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Проведена оценка морфологических особенностей, пролиферативной активности и пластичности культур мультитипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костномозгового происхождения и клеток, выделенных из стромально-васкулярной фракции жировой ткани крыс. Принадлежность клеточных культур к ММСК верифицирована по негативному определению содержания маркеров CD 34 и положительной экспрессии CD 90, а также при проведении индуцированной дифференцировки. Пролиферативная активность клеток определена при выполнении цитохимического окрашивания на содержание Ki-67 с качественной регистрацией интенсивности свечения при флуоресцентной микроскопии. С использованием ХТТ реагента изучена сравнительная метаболическая активность указанных клеточных популяций на децеллюляризованных матриксах пищевода и диафрагмы крыс, полученных детергент-энзиматическим методом. Цитотоксические свойства каркасов и жизнеспособность клеточных линий при рецеллюляризации децеллюляризованных матрикс пищевода и диафрагмы крыс оценены путем количественного определения процентного содержания клеток с активным метаболизмом. С учетом полученных данных предложена наиболее оптимальная клеточная фракция для рецеллюляризации биологических каркасов.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, биологические каркасы, цитотоксичность, жировая ткань, костный мозг

The morphological features, proliferative activity and flexibility of rat mesenchymal multipotent stem cells (MSC) bone marrow derived and isolated from the adipose tissue stromal-vascular fraction were evaluated. MMSCs were verified by the negative CD 34 and the positive CD 90, and by induced differentiation. Cells proliferative activity was evaluated by Ki-67 cytochemical staining with qualitative measurement of the luminescence intensity. XTT reagent was used to study the comparative cell populations' viability on decellularized rat oesophageal and diaphragm matrices, obtained by detergent-enzymatic method. The cytotoxic properties of the scaffolds and cell lines viability at recellularization of decellularized rat esophagus and diaphragm matrices were evaluated by quantitating the percentage of metabolically active cells. Taking into account the obtained data, the most optimal cell fraction for biological scaffolds recellularization was selected.

Keywords: mesenchymal stem cells, biological scaffolds, cytotoxicity, adipose tissue, bone marrow

Для цитирования: Кувда Е. В., Губарева Е. А., Гуменюк И. С., Накохов Р. З., Пузанов Д. П. МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС ДЛЯ РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИКСОВ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1.2):203-207. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14015>

For citation: Kuevda E. V., Gubareva E. A., Gumenyuk I. S., Nakokhov R. Z., Puzanov D. P. BONE MARROW AND ADIPOSE-DERIVED RAT MESENCHYMAL STEM CELLS FOR RECELLULARIZATION OF BIOLOGICAL MATRICES. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1.2):203-207. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14015> (In Russ.)

ЖСП – жизнеспособность клеток
ММСК – мультитипотентные мезенхимные стромальные клетки
ММСК-КМ – мультитипотентные мезенхимные стромальные клетки костномозгового происхождения

ММСК-СВФ – мультитипотентные мезенхимные стромальные клетки стромально-васкулярной фракции
ХТТ – соль 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфанил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксанилида
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) успешно используются для проведения клеточной терапии, при разработке экспериментальных методов восстановительного лечения дегенеративных заболеваний, а также в регенеративной медицине в качестве основного клеточного ресурса при рецеллюляризации биологических и синтетических полимерных каркасов [1–4]. Наиболее распространенными источниками ММСК являются костный мозг (ММСК-КМ) и стромально-васкулярная фракция жировой ткани (ММСК-СВФ) [5]. Преимуществом последней является менее инвазивная методика выделения клеток в достаточном количестве, в том числе для клинического применения [2, 6].

Клетки стромально-васкулярной фракции обладают большей пролиферативной емкостью в сравнении с ММСК-КМ и более выраженной способностью к индуцированной дифференцировке при смене микроокружения [4]. В то же время ряд исследований [5, 7] указывают на наличие типовых различий в характеристиках стволовых клеток, полученных из разных источников. Несмотря на то что пролиферативный и дифференцировочный потенциал ММСК-СВФ широко исследуется [2, 4, 5, 7], сравнительной оценки особенностей клеточного роста и жизнеспособности ММСК-КМ и ММСК-СВФ в зависимости от собственных свойств биологических каркасов не проводилось.

Целью настоящего исследования является сравнительная характеристика морфологии, пластичности и жизнеспособности ММСК-КМ и ММСК-СВФ при рецеллюляризации биологических каркасов пищевода и диафрагмы крыс.

Материал и методы. Для выделения ММСК, а также для создания биологических каркасов пищевода и диафрагмы использовали 25 самцов крыс линии Wistar массой тела 230 ± 50 г. Выделение костного мозга и жировой ткани, а также эксплантация органокомплексов выполнялась после эвтаназии животных при введении летальной дозы барбитуратов (150 мг/кг) интраперитонеально.

ММСК-СВФ выделяли после гомогенизации жировой ткани крыс ферментативным способом по модификации ранее известного протокола [4] путем комбинации 0,12 % раствора коллагеназы I типа и 0,25 % раствора трипсина в фосфатном буфере (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Время воздействия ферментов составило 45 минут, после чего клетки центрифугировали, отмывали в среде, содержащей 2 % фетальной бычьей сыворотки, фильтровали через 70 мкм нейлоновый мембранный фильтр, повторно центрифугировали и ресуспендировали в культуральной среде DMEM стандартного состава (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Плотность засеивания клеток на флакон составила 5×10^5 клеток/см². ММСК-КМ выделяли по ранее описанной методике [8], плотность посева на флакон соответствовала указанной для ММСК-СВФ. Смену среды проводили на следующие сутки после посева на флакон, а затем каждые три дня. При достижении 70–80 % конфлюэнтности монослоя производили пересев клеточных культур до получения 3–5 пассажей включительно. Морфологию клеток при исследовании культур оценивали с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX51 (Токио, Япония)

путем получения фазово-контрастных изображений. Последующую обработку микрофотографий с целью повышения уровня локального микроконтраста, выравнивания уровней экспозиции осуществляли в программном обеспечении RawTherapee и GIMP.

Принадлежность клеточных линий к ММСК верифицировали по отрицательной экспрессии поверхностных маркеров при проведении цитохимического окрашивания с использованием моноклонального антитела к CD 34 в качестве первичного в разведении 1:50 (ab 8536, Abcam, США); в качестве вторичного антитела использовали Alexa Fluor 555 в разведении 1:400 (ab 150118, Abcam, США). Иммунофенотипирование клеточных культур проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD, США) с использованием антител к CD 90 – FITC на длине волны 488 нм.

Пластичность полученных ММСК-КМ и ММСК-СВФ на 3 пассаже оценивали при проведении индуцированной дифференцировки в адипо-, хондро- и остеогенном направлениях с использованием специализированных сред StemPro (Thermo Fisher Scientific Inc., США) по протоколу производителя. Адипогенную дифференцировку выявляли по истечении семи дней с помощью красителя Oil Red O качественно при микроскопии и количественно при регистрации оптической плотности содержимого окрашенных и контрольных ячеек на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Оценку наличия хондрогенной дифференцировки проводили на 14 день при окрашивании толуидиновым синим и альциановым синим. Минерализованный клеточный матрикс при остеогенной дифференцировке выявляли качественно при окрашивании ализариновым красным.

Пролиферативную активность ММСК-КМ и ММСК-СВФ оценивали путем регистрации положительного окрашивания Ki-67 при цитохимическом исследовании (разведение 1:50, ab 15580, Abcam, США), в качестве вторичного антитела использовали Alexa Fluor 488 (разведение 1:400, ab 150081, Abcam, США).

Биологические каркасы пищевода и диафрагмы крыс получены при децеллюляризации детергент-энзиматическим методом. Для создания ацеллюлярного матрикса диафрагмы применялся модифицированный протокол, включающий обработку очищенной водой, 4 % раствором натриевой соли дезоксихолевой кислоты, фосфатным солевым буфером, свиной панкреатической ДНКазой I с проведением одновременной перфузии и встряхиванием образца на ротирующей платформе [7]. При децеллюляризации пищевода крыс на нативный орган последовательно воздействовали очищенной водой, 4 % раствором натриевой соли дезоксихолевой кислоты в сочетании с ЭДТА, свиной панкреатической ДНКазой I и фосфатным солевым буфером. Скорость перфузии растворов составила 6 мл/мин, общая продолжительность воздействия – 7 часов 10 минут.

Для оценки жизнеспособности (ЖСП) клеток костномозгового и стромально-васкулярного происхождения на биологических каркасах использовали метод статической рецеллюляризации в 96-луночных планшетах. Клеточную суспензию в объеме 30 тыс. клеток на 100 мкл культуральной среды наносили пло-

скостным методом однократно с помощью пипеточного дозатора [4]. Метаболическую активность клеток регистрировали после выполнения ХТТ-теста через 48 часов культивирования в стандартных условиях путем измерения оптической плотности на многофункциональном ридере FilterMax F5 (Molecular Devices, США) по протоколу производителя. Расчет показателей ЖСП клеток и цитотоксического индекса проводился в процентах [9]. Цитотоксические свойства каркасов также оценивали после проведения окрашивания реагентом Alamar blue (AlamarBlue® Cell Viability Reagent, Invitrogen, Великобритания) через 48 часов культивирования с флуоресцентной детекцией при длинах волн 535/595 нм и детекцией абсорбции при длине волны 595 нм.

Статистическая обработка результатов произведена с использованием пакета GraphPadPrism version 6.04. (источник www.graphpad.com). Полученные результаты представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение и обработаны с использованием критерия Стьюдента для парных и непарных t-тестов. Достоверными признавались различия при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Первичные культуры ММСК-КМ и ММСК-СВФ обладали морфологической гетерогенностью: фибробластоподобные веретеновидные клетки соседствовали с округлыми прикрепленными клетками, в первичной культуре ММСК-СВФ наряду с этим также присутствовали клетки с вакуолями в цитоплазме. Гетерогенность клеточных популяций сохранялась в течение первых пяти суток культивирования, что соотносится с литературными данными о наличии в первичных культурах ММСК клеток с экспрессией гемопоэтических и эндотелиальных маркеров [5]. После пересева клетки обеих фракций сохраняли морфологически сходную фибробластоподобную форму. Перинуклеарная цитоплазматическая зернистость, косвенно характеризующая степень секреторной активности [5], была более выражена у ММСК-КМ без статистически достоверной значимости (рис. 1). Первичные культуры ММСК достигали 80–90 % конфлюэнтности в разные сроки: ММСК-СВФ – на 14 день, ММСК-КМ – на 21 день, что может свидетельствовать о более высокой пролиферативной активности клеток, полученных из стромально-васкулярной фракции жировой ткани. Также в культуре ММСК-СВФ процент клеточных ядер, положительно окрашивающихся Ki-67, составил 30,01 %, в то время как в культуре СКМ – 2,84 %.

Рис. 1. Морфология ММСК на 1, 5 и 7 дни после пересева.
Ув. 200, фазово-контрастная микроскопия

По данным количественного анализа, процесс накопления Oil Red O более интенсивно протекал при индукции ММСК-КМ ($p=0,0293$), несмотря на значительный разброс показателей. Накопление красителя в контрольных неиндуцированных клетках также более выражено для клеток костномозгового происхождения ($p=0,0003$) (рис. 2а). Как ММСК-СВФ, так и ММСК-КМ позитивно окрашивались толуидиновым синим после культивирования с добавлением индукторов хондрогенеза, что подтверждало наличие сульфатированных гликозаминогликанов и дифференцировку клеток в хондрогенном направлении. Культивирование ММСК-СВФ и ММСК-КМ с добавлением среды-индуктора адипогенеза способствовало появлению клеток с крупными вакуолями в цитоплазме, интенсивно окрашивающихся Oil Red O (рис. 2б). Что касается культивирования в остеогенной среде, клетки обеих популяций продемонстрировали равную способность к кальцификации внеклеточного матрикса и формированию многослойных узлов, окрашивающихся ализариновым красным.

Каркас пищевода в равной степени поддерживает пролиферацию ММСК-ЖТ и ММСК-КМ (35,64 и 32,94 % соответственно; рис. 3а). В то же время ацеллюлярный матрикс пищевода обладает цитотоксическими свойствами (рис. 3б), что может быть связано с воздействием детергентов и энзимов в

процессе децеллюляризации. Однако выживаемость клеток является достаточной для использования обеих популяций ММСК при рецеллюляризации пищевода с целью создания клеточного микроокружения. В перспективе при проведении *in vivo* исследований тканеинженерных конструкций продукты метаболизма ММСК-КМ и ММСК-СВФ способны проявлять эффект привлечения собственных кле-

ток реципиента на каркас [8]. При исследовании рецеллюляризированных каркасов диафрагмы жизнеспособность ММСК-СВФ регистрировалась как предельно низкая (0,69 %), в то время как выживаемость ММСК-КМ составила 25,09 % (рис. 3а). Цитотоксичность биологического каркаса диафрагмы при заселении ММСК-СВФ и ММСК-КМ составила 99,31 и 74,91 % соответственно (рис. 3б).

Рис. 2. Анализ степени выраженности индуцированной адипогенной дифференцировки ММСК обеих фракций: а – количественная, б – качественная оценка эффективности индукции при окрашивании Oil Red O; * – $p=0,0293$; *** – $p=0,0003$

Рис. 3. Сравнительная оценка цитотоксических свойств каркасов пищевода и диафрагмы после рецеллюляризации: а – жизнеспособность клеток на каркасах; б – цитотоксические индексы каркасов

Анализ поведения ММСК различных фракций показывает, что морфология клеток ММСК-СВФ и ММСК-КМ сходная, фибробластоподобная. Проллиферативная активность клеток обеих фракций не имеет существенных отличий и соотносится с литературными данными [5]. Обе популяции в присутствии индукционных сред способны к дифференцировке в три клеточные линии, однако индуцированные ММСК-КМ несколько более активно накапливают краситель при адипогенной дифференцировке. В то же время при оценке цитотоксических свойств каркасов пищевода и диафрагмы установлено, что ММСК-СВФ не проявляют тропности к скелетным мышцам, ММСК-КМ метаболически более активны при заселении ими ацеллюлярного диафрагмального матрикса. Это находит подтверждение при оценке цитотоксических свойств каркасов и жизнеспособности клеток на децеллюляризованных матриксах колориметрическими и флуоресцентными методами, а также данными количественного расчета показателей клеточной активности. Необходимо дальнейшее изучение ад-

гезионных и пролиферативных свойств ММСК-СВФ и биосовместимости и тропности компонентов внеклеточного матрикса самого каркаса диафрагмы для уточнения природы данного явления. Также целесообразно изменить способ введения клеточной суспензии при рецеллюляризации каркасов с плоскостного на перфузионный, что позволит клеткам не только прикрепиться к поверхности децеллюляризованного матрикса, но и проникнуть вглубь него, так как длительное культивирование на поверхности каркаса способно снижать метаболическую активность клеток.

Заключение. Использование ММСК-СВФ в качестве источника клеточного материала для рецеллюляризации биологических каркасов позволяет получать большее количество клеток в связи с более высокой пролиферативной активностью. Выбор клеточной линии для заселения ацеллюлярного матрикса должен определяться характером введения суспензии клеток и цитотоксическими свойствами самого рецеллюляризуемого каркаса. В то же

время упомянутые свойства матрикса зависят от выбранного протокола децеллюляризации и времени экспозиции агрессивных агентов, что оказывает немаловажное влияние на получение морфологически и функционально полноценной тканеинженерной конструкции.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке комплексной НИР: «Клеточные механизмы регенерации интраоракальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».

Информированное согласие: Эксперименты были выполнены при соблюдении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1972) и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом (Краснодар, протокол № 21/1).

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Кувда Е. В., Губарева Е. А., Сотниченко А. С., Гуменюк И. С., Гилевич И. В. [и др.]. Опыт перфузионной рецеллюляризации биологического каркаса легких крысы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2016;18(1):38-44. [Kuevda E. V., Gubareva E. A., Sotnichenko A. S., Gumenyuk I. S., Gilevich I. V. [et al.]. Experience of perfusion recellularization of biological lung scaffold in rats. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. – *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2016;18(1):38-44. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2016-1-38-44>
2. Семенова В. М., Лисянский Н. И., Стайно Л. П., Бельская Л. Н., Егорова Д. М. Проллиферативный и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в условиях культивирования. *Український нейрохірургічний журнал*. 2014;(3):24-29. [Semenova V. M., Lisianskiy M. I., Stayno L. P., Belska L. M., Yegorova D. M. Proliferative and differentiated potential of mesenchymal stem cells from adipose tissue under cultivation conditions. *Ukrayinskiy neyrokhirurgichniy zhurnal*. – *Ukrainian neurosurgical journal*. 2014;(3):24-29. (In Russ.)].
3. Badylak S. F., Taylor D., Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2011;(13):27-53. <http://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124743>
4. Shi J., Liang J., Guo B., Zhang Y., Hui Q. [et al.]. Adipose-derived stem cells cocultured with chondrocytes promote the proliferation of chondrocytes. *Stem Cells International*. 2017;2017:1-18. <http://doi.org/10.1155/2017/1709582>
5. Зафранская М. М., Ламовская Н. В., Нижегородова Д. Б., Юркевич М. Ю., Багатка С. С. [и др.]. Морфология и кинетика роста и фенотип мезенхимальных стволовых клеток мозга и жировой ткани человека. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2010;(4):86-93. [Zafranskaya M. M., Lamovskaya N. V., Nizheharodova D. B., Yurkevich M. Yu., Bagatka S. S. [et al.]. Morphology, growth kinetics and cell phenotype of bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. – *Immunopathology, allergology, infectology*. 2010;(4):86-93. (In Russ.)].
6. Conconi M. T., De Coppi P., Bellini S., Zara G., Sabatini M. [et al.]. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. *Biomaterials*. 2005;(15):2567-2574. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.035>
7. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klubar H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;(24):1294-1301. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
8. Gubareva E. A., Sjöqvist S., Gilevich I. V., Sotnichenko A. S., Kuevda E. V. [et al.]. Orthotopic transplantation of a tissue engineered diaphragm in rats. *Biomaterials*. 2016;77:320-335. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.020>
9. Бараева В. В., Попова В. М., Пашкова Г. С., Исаджаниян К. Е., Никитин В. В. [и др.]. Изучение эффективности и безопасности применения антимикробных средств. *Исследования и практика в медицине*. 2015;(2):35-42. [Bagaeva V. V., Popova V. M., Pashkova G. S., Isadzhanyan K. E., Nikitin V. V. [et al.]. The study the efficacy and safety of antimicrobial agents. *Nauchno-prakticheskiy zhurnal Issledovaniya i praktika v Meditsine*. – *Research practical medicine journal*. 2015;(2):35-42. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2015-2-3-35-42>

Сведения об авторах:

Кувда Елена Вячеславовна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины;
тел.: 89189351760; e-mail: elenakuevda@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0002-7585-9923>

Губарева Елена Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией;
тел.: 89181327857; e-mail: g_lena82@list.ru; <http://orcid.org/0000-0003-4307-4774>

Гуменюк Иван Сергеевич, научный сотрудник;
тел.: 89183924111; e-mail: meklon@gmail.com

Накохов Рамазан Заурбиевич, младший научный сотрудник;
тел.: 89649169763; e-mail: rnz00009@gmail.com

Пузанов Дмитрий Петрович, ассистент кафедры общей хирургии;
тел.: 89284334568; e-mail: dmitri-puzanov@mail.ru