

УДК 576.3

**ХАРАКТЕРИСТИКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ЛОШАДЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ПУПОВИННОЙ КРОВИ**

С.А. Васильева, Д.Г. Коровина, Е.В. Викторова, И.П. Савченкова

*Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко, Москва, Россия*

В последние годы большое научное внимание уделяется костно-суставным заболеваниям лошадей. Развитие воспалительных и ревматических заболеваний в суставах может привести к тяжелым дегенеративным изменениям. Высокая распространенность ортопедических патологий у лошадей и их влияние на спортивные показатели в сочетании с высокой стоимостью терапевтических процедур формируют важную задачу для ветеринарной медицины. В связи с этим разрабатываются новые методы клеточно-тканевой инженерии, направленные на стимулирование / усиление регенерации гиалинового хряща и сохранение целостности его структуры. Многообещающим

инструментом клеточной терапии являются мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК). Они могут быть использованы для лечения большого числа ортопедических патологий, в том числе травм сухожилий и связок. Широкое терапевтическое использование данных клеток обусловлено низкой иммуногенностью, а также выраженными иммуносупрессивными свойствами против Т-лимфоцитов. Клетки с фенотипом, подобным ММСК, можно выделять из таких тканей млекопитающих как костный мозг, жировая ткань (ЖТ), плацента, периферическая кровь, пуповинная кровь (ПК) и др., однако именно ПК и ЖТ являются перспективными источниками ММСК вследствие минимально инвазивных методов получения (1, 2, 3). В связи с этим, целью представленного исследования было изучить свойства клеток, с фенотипом подобным ММСК, выделенных из ЖТ и ПК лошадей, *in vitro*.

ММСК из ЖТ выделяли по методике, описанной нами ранее (4), с помощью последовательной механической и ферментативной обработок ЖТ. Для ферментативной диссоциации ткани обрабатывали 0,01 % раствором коллагеназы II типа на основе DMEM-LG (содержание глюкозы 1 г/л, «ПанЭко», Россия) в течение 60 мин при 37°C. ММСК из ПК были выделены нами ранее в градиенте плотности Lympholyte-H («Cedarlane», Канада) с пробирками SepMate-15 («StemCellTechnologies», США) (5,6). Клетки подсчитывали в камере Горяева и переносили в культуральные флаконы в концентрации $4,8 \times 10^4$ кл/см². В качестве ростовой среды для культивирования ММСК использовали питательную среду DMEM-LG, дополненную сывороткой крови плодов коров (конечная концентрация в среде – 10 %) («GE Healthcare», USA) и антибиотиками (конечная концентрация стрептомицина – 50 мкг/мл, пенициллина – 50 Ед./мл).

Сравнительный анализ свойств полученных клеточных популяций выявил, что клетки, выделенные из ЖТ и ПК, имели схожие морфологические характеристики и представляли собой два типа: мелкие округлые и более крупные узкие веретенообразные с фибробластоподобной морфологией. Клетки обладали сильной адгезией к культуральному пластику и высокой клонообразующей способностью – 90,0 % у ММСК, выделенных из ЖТ, и 92,0 % у ММСК, полученных из ПК. Время удвоения ММСК выделенных из ЖТ и ПК, варьировало от 48 до 65 ч и от 52 до 72 ч соответственно. Способность ММСК к индукционной дифференцировке в остео-, хондро- и адипогенном направлениях *in vitro* изучали с использованием наборов StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit и StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit («Gibco», США). Адипогенная дифференцировка сопровождалась появлением клеток округлой формы с липидными везикулами в цитоплазме, которые выявлялись окраской специфическим красителем жировым красным О. Окраска ММСК, выделенных из ЖТ, на специфическую активность эндогенной щелочной фосфатазы оказалась положительной на 14 сут культивирования в индукционной среде. Окрашивание ММСК, полученных из ЖТ, методом серебрения Косса выявило секрецию внеклеточного матрикса в виде фосфатов и карбонатов в клетках на 21 сут индукции. После культивирования клеток, выделенных из ЖТ, в хондрогенной среде в течение 14 сут, было обнаружено формирование многослойных скоплений с большим количеством матрикса, окрашивающихся альциановым синим, в которых визуализировались изогенные группы, подобные лакунам гиалинового хряща. На 21-е сут клетки формировали плотные микрогранулы, в которых был выявлен гликозаминогликановый матрикс. В случае хондрогенной дифференцировки ММСК, полученных из ПК, с помощью гистологических методов также было выявлено наличие клеток с морфологией хондроцитов. Таким образом, клеточные популяции, выделенные нами из ЖТ и ПК лошадей, имеют свойства и признаки, характерные для ММСК. Наши исследования продемонстрировали, что обе культуры клеток способны при индукции формировать клетки хрящевой и жировой ткани *in vitro* и могут представлять собой перспективный материал для ветеринарной медицины и сельскохозяйственной биотехнологии. Полученные культуры клеток были размножены и хранятся в криобанке лаборатории стволовой клетки ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Работа выполнялась в рамках НИР № 0578–2018–0006 «Создание новых клеточных систем с заданными свойствами на основе стволовых клеток млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных для ветеринарии, вирусологии и биотехнологии».

ЛИТЕРАТУРА

Савченкова И.П. Создание коллекции стволовых клеток млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных / И.П. Савченкова, С.А. Васильева, Д.Г. Коровина, Е.В. Викторова, И.М. Волкова, Е.А. Савченкова // В сборнике: Биотехнологии: состояние и перспективы развития. Науки о жизни Материалы международного форума. – 2018. – С. 837–838.

Коровина Д.Г. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, выделенные из костного мозга овцы: получение и криоконсервирование / Д.Г. Коровина, И.М. Волкова, С.А. Васильева, М.И. Гулюкин, И.П. Савченкова // Цитология. – 2019. – Т. 61. – № 1. – С. 35–44.

Савченкова И.П. Мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани кошек и собак в культуре / И.П. Савченкова, С.А. Васильева, Д.Г. Коровина, А.А. Шабейкин, А.М. Гулюкин // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54. – № 2. – С. 395–403.

Савченкова И.П. Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков / И.П. Савченкова, Л.К. Эрнст, М.И. Гулюкин, Е.В. Викторова. – М.: ООО "Издательство "Спутник+", 2010. – 22 с.

Коровина Д.Г. Пуповинная кровь лошадей как источник мультипотентных мезенхимных стволовых клеток / Д.Г. Коровина, К.П. Юров, И.М. Волкова, С.В. Алексеенкова, С.А. Васильева, Е.А. Савченкова, И.П. Савченкова // Коневодство и конный спорт. – 2015. – № 6. – С. 31–33.

Коровина Д.Г. Характеристика мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови лошадей / Д.Г. Коровина, К.П. Юров, С.В. Алексеенкова, Е.А. Савченкова, И.П. Савченкова // Российская сельскохозяйственная наука. – 2017. – № 2. – С. 51–54.