

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ОВЦЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ

© 2019 г. Д. Г. Коровина¹, *, И. М. Волкова¹, С. А. Васильева¹, М. И. Гулюкин¹, И. П. Савченкова¹

¹Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Москва, 109428 Россия

*E-mail: darya.korovina@gmail.com

Поступила в редакцию 13.07.2018 г.

После доработки 20.09.2018 г.

Принята к публикации 26.09.2018 г.

Овцы часто используются в качестве доклинических крупных животных моделей для тестирования терапевтического потенциала мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК). В результате оптимизации метода выделения в градиент плотности фиколла из костного мозга (КМ) овец получена культура клеток с характеристиками, подобными ММСК. Продемонстрировано преимущество использования протоколов со специализированной пробиркой SerMate-15 по сравнению с выделением по классическому методу. Полученные клетки обладали сильной адгезией к культуральному пластику, фибробластоподобной морфологией, способностью при индукции формировать *in vitro* клетки жировой, костной и хрящевой тканей. При адипогенной дифференцировке на 14-е сут формировались адипоциты с липидными везикулами, которые выявлялись окраской специфическим красителем жировым красным О. В остеогенной среде на 14-е сут появлялась специфическая активность эндогенной щелочной фосфатазы. Окрашивание ММСК методом серебрения Косса выявило наличие нерастворимых солей кальция в межклеточном пространстве. Хондрогенная дифференцировка обнаруживалась на 14-е сут и сопровождалась появлением многослойных скоплений с большим количеством матрикса, в которых визуализировались изогенные группы, подобные лакунам гиалинового хряща. На 21-е сут клетки формировали плотные микрогранулы, в которых выявлялся гликозаминогликановый матрикс. Сравнительный анализ жизнеспособности клеток на нулевом пассаже после заморозки в трех криозащитных средах свидетельствует о хорошем состоянии размороженных клеток (более 70%). Полученная культура ММСК КМ овцы на 2–3-м пассажах депонирована в специализированную Коллекцию перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных при ВИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН и может использоваться в доклинических исследованиях.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, костный мозг, овца, выделение, культивирование, дифференцировка, криоконсервирование

DOI: 10.1134/S0041377119010036

Из-за низкой стоимости овцы часто используются в качестве крупных животных моделей, для доклинического тестирования терапевтического потенциала мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) или тканеинженерных конструкций на их основе для лечения дегенеративных заболеваний суставов (Zscharnack et al., 2010; Sanjurjo-Rodriguez et al., 2017). Описаны эксперименты по возможному замещению имплантатами костных дефектов у баранов (Свиридова и др., 2010). При этом отмечено существенное сокращение сроков регенерации костной ткани при использовании аутоген-

ных ММСК в конструкциях на основе натуральных кораллов (Сергеева и др., 2009).

Первая опубликованная работа по выделению ММСК из КМ овец показала, что данные клетки имели фибробластоподобную морфологию и могли быть индуцированы в адипогенном и остеогенном направлениях *in vitro* (Jessop et al., 1994). С тех пор сообщалось о получении ММСК овец из пуповинной крови, жировой ткани, периферической крови, печени, амниотической жидкости, пульпы зуба, синовиальной мембраны, дермиса, волосяных фолликул и эндометрия (Music et al., 2018).

ММСК, выделенные из костного мозга (КМ) овец, так же как и других видов животных, являются негемопоэтическими клетками, которые характеризуются *in vitro* адгезией к пластику, фибробластоподоб-

Принятые сокращения: ДМСО — диметилсульфоксид, КМ — костный мозг, ММСК — мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, ПК — пуповинная кровь, СКПК — сыворотка крови плодов коров, ЩФ — щелочная фосфатаза.