

УДК 591

Ю.В.Маленьких (5 курс, каф. ФХБК), Г.П.Пинаев, д.б.н., проф. (ИнЦ РАН)

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПО СТЕПЕНИ АДГЕЗИИ, ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИИ КЛЕТОК С НАИБОЛЕЕ ВЫРАЖЕННОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К КАРДИОМИОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

В настоящее время большое количество исследований посвящено изучению возможности использования стромальных клеток костного мозга (СККМ) для терапии инфаркта миокарда и хронической сердечной недостаточности. Показана возможность дифференцировки стромальных клеток в кардиомиоциты *in vitro*, но нерешенным остается вопрос об однонаправленности дифференцировки клеток, введенных в поврежденный миокард. Одним из подходов к решению проблемы является выделение фракции стромальных клеток с наиболее выраженной способностью к мышечной и, более того, кардиомиоцитарной дифференцировке.

Одним из наиболее легко осуществимых и доступных способов фракционирования клеток является адгезия. Неоднородность культуры СККМ дает возможность предположить, что стромальные клетки содержат разные наборы рецепторов клеточной адгезии и, соответственно, могут различаться по адгезионной способности. Таким образом, культура может быть фракционирована по степени адгезии клеток на разных субстратах.

Целью данной работы является описание характеристик фракций СККМ, полученных методом адгезии, и определение наиболее предрасположенной к кардиомиоцитарной дифференцировке клеточной фракции.

Выделение и культивирование СККМ осуществляли по отработанной методике. Разделение клеток на фракции проводили по степени адгезии на пластике. Экспериментальным путем были подобраны оптимальные временные промежутки для адгезии: 1, 3, 5 и 10 минут. Более длительные интервалы времени не применяли вследствие известной высокой адгезионной способности СККМ. Опыты по адгезии повторяли трижды для получения более чистых фракций. Результаты фракционирования анализировали при помощи инвертированного микроскопа. Для сравнения пролиферативной активности клеток разных фракций, а также для определения степени спонтанной остеогенной дифференцировки в них, клетки окрашивали на щелочную фосфатазу.

Для индукции кардиомиоцитарной дифференцировки на клетки всех фракций в течение суток воздействовали 5'-азацитидином. После отмены индуктора, клетки на протяжении двух недель культивировали в среде с низким содержанием сыворотки, после чего анализировали полученные результаты. Для контроля кардиомиоцитарной дифференцировки клетки всех фракций окрашивали на гликоген и другие ШИК-положительные соединения (ШИК-реакция), также была осуществлена окраска клеточного цитоскелета: актиновых филаментов и мышечной изоформы миозина.

В результате разделения СККМ по степени адгезии на пластике, были выделены фракции различных по морфологии и поведению в культуре клеток. Было отмечено малое содержание высокоадгезивных (1 минутная адгезия) клеток в суммарной культуре и их неспособность выживать без окружения. Анализ результатов индукции кардиомиоцитарной дифференцировки показал наибольшую предрасположенность фракции 3-х минутной адгезии к дифференцировке в данном направлении. Сходные результаты, полученные для контрольных и дифференцированных клеток данной фракции, указывают на возможность спонтанной дифференцировки в мышечном направлении.

Данная работа является одним из первых шагов запланированных исследований, посвященных изучению стромальных клеток костного мозга и возможных направлений их дифференцировок. В дальнейшем мы планируем сравнить адгезионную способность СККМ на разных субстратах, изучить степень предрасположенности каждой из фракций к разным типам дифференцировки.

Выделение фракции стромальных клеток костного мозга, дифференцирующихся преимущественно в кардиомиоцитарном направлении, может стать существенным шагом на пути внедрения клеточной терапии инфаркта миокарда и хронической сердечной недостаточности в медицинскую практику.