

УДК 57.086.83:591.412

Г.Е.Левина (5 курс, каф. ФХБК), Г.П.Пинаев, д.б.н., проф. (ИнЦ РАН)

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СЕРДЦА, ОБОГАЩЕННОЙ КАРДИАЛЬНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ

Согласно последним данным, стволовые клетки костного мозга при попадании в поврежденный миокард способны дифференцироваться в кардиомиоциты [1]. Однако не изучены факторы, влияющие на преобразование клеток костного мозга: ими могут быть как непосредственно клетки сердца, так и биоактивные соединения, выделяемые клетками во внеклеточную среду.

Возможно, что на дифференцировку стволовых клеток влияет определенный тип клеток сердца. Гомогенную культуру кардиомиоцитов можно получить, добавляя в смешанную культуру цитостатики, ингибирующие синтез ДНК в пролиферирующих клетках (например, АгаС). Культуру эндотелиальных клеток сердца можно получить с помощью раздельного центрифугирования исходной суспензии клеток. Задачей данной работы было получение культуры, обогащенной сердечными фибробластами, для дальнейшего изучения влияния гомогенных культур клеток сердца на стромальные клетки костного мозга. Для этого использовали метод фракционирования исходной суспензии по степени адгезии клеток к субстрату с последующим пассированием.

Смешанную культуру клеток сердца получали из материала сердца неонатальных крыс (возраст крысят: 1–4 дня) по методике предложенной Семеновой Е.Г. [2]. Разделение клеток сердца на фракции осуществляли по степени их адгезии к пластику. Для этого свежeweделенную суспензию клеток сердца неонатальных крыс (КСНК) инкубировали 1 час на качалке при 37°C в ростовой среде ДМЕМ с 10% СЭК (для инактивации протеаз и восстановления рецепторов клеток). Затем клетки переносили в чашки Петри диаметром 35 мм. Через 1 минуту суспензию с неприкрепившимися клетками аккуратно собирали и переносили в новую чашку Петри. В первую чашку добавляли свежую ростовую среду для культивирования клеток. Во второй чашке клетки инкубировали 3 минуты, а затем неприкрепившиеся клетки в среде переносили в третью чашку Петри и т.д. вплоть до прикрепления клеток к пластику в течение 1 часа.

Первоначально адгезию проводили в течение от 1 минуты до 1 часа. Во фракциях, полученных за 30 минут и за 1 час наблюдалось большое количество прикрепившихся клеток, что не позволяло их идентифицировать. Во фракциях, полученных за 1 минуту адгезии, наоборот, наблюдали небольшое число клеток, в основном, единичные мелкие клетки, которые в дальнейшем не пролиферировали. Поэтому было выбрано оптимальное время адгезии, которое составило 3, 5, 10 и 15 минут.

Наблюдения через 7 суток культивирования показали, что в 3-минутной фракции клеток меньше, чем во всех остальных, наблюдается несинхронные сокращения отдельных групп кардиомиоцитов. В 5-минутной фракции наблюдается ритмичное синхронное сокращение практически всем монослоем, количество фибробластоподобных клеток больше чем в 3-минутной фракции. В 10- и 15-минутных фракциях практически одинаковая ситуация: плотный монослой клеток, есть участки из фибробластоподобных клеток («булыжная мостовая»), сокращение кардиомиоцитов синхронное, но слабее чем в 5-минутной фракции.

Для получения фракций наиболее обогащенных фибробластами, фракционирование с помощью адгезии повторяли 2-3 раза последовательно через 6-7 суток культивирования.

Были получены следующие результаты: после первого пересева с повторной адгезией в культуре КСНК наблюдали единичные сокращающиеся кардиомиоциты, после второго пересева с адгезией количество кардиомиоцитов в культуре уменьшилось, кардиомиоциты теряли способность к сокращению. После проведения трех адгезий во всех фракциях наблюдали увеличение фибробластоподобных и уменьшение кардиомиоцитоподобных клеток. В чашках с высокой плотностью были обнаружены большие участки из фибробластоподобных клеток, а также уплотненные участки монослоя, что характерно для культуры фибробластов с высокой плотностью клеток.

Таким образом, была отработана методика разделения исходной культуры на отдельные фракции с помощью селективной адгезии. По литературным данным время, необходимое для полного распластывания кардиомиоцитов, составляет 48 часов, для фибробластов и эндотелиальных клеток – 2-4 часа. Мы показали, что первичное «заякоривание» клеток (как кардиомиоцитов, так и фибробластов) происходит уже в первые минуты нахождения клеток в культуральной посуде.

С помощью повторного фракционирования по способности к адгезии была получена культура, обогащенная на 90% фибробластоподобными клетками. При пассировании клеточных культур миокарда выживают главным образом немышечные клетки, что, по-видимому, связано с прочным прикреплением миоцитов к подложке, необходимым при сократительной функции.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Кругляков П.В., Соколова И.Б. и др. Цитология, 2004, т.46, №12, с.1043-1054;
2. Семенова Е.Г., Ерохина И.Л. и др. Цитология, 2003, т.45, №7, с. 621-627.