

Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в фибриновом геле.

Магистрант кафедры генетики
Костюнина В.С.
Научный руководитель
Глушен С.В.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.

- Большой проблемой для здравоохранения являются заболевания суставов. По данным ВОЗ ими страдает около 4% населения земного шара, с заболеваниями крупных суставов связано 30% случаев временной нетрудоспособности и 10% инвалидности. Вследствие крайне низких репаративных способностей суставного гиалинового хряща, подобные дефекты сохраняются в течение всей жизни человека и вызывают прогрессирование дегенеративных изменений в суставе.
- Один из методов лечения – трансплантация аутологичных хрящевых клеток. Сегодня перспективы имеет тканевая инженерия на основе взрослых так называемых мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга (КМ) с целью получения предшественников хондроцитов, способных *in vivo* к регенерации хрящевой ткани.
- Но существует проблема эффективного способа имплантации МСК в очаг поражения. Поэтому для этой цели необходимо использовать материалы–носители, которые должны не вызывать явной воспалительной реакции, иметь такие параметры микрорельефа поверхности, которые обеспечивали бы оптимальные условия для адгезии, пролиферации, миграции иммобилизованных на них клеток. Показано наличие секреции хрящевого матрикса *in vivo* при использовании инкапсулированных хондроцитов в гидрогелях из фибрина. Но для внедрения этого материала в клиническую практику необходимо изучить процесс дифференцировки клеток в условиях, создаваемых фибриновым гелем.



Цели и задачи.

Цель работы:

- Повысить эффективность технологий дифференцировки стволовых клеток в хондрогенном направлении *in vitro* за счет создания трёхмерной клеточной конструкции на основе гемостатического фибринового средства «Фибриностат» (РНПЦ ГТ)

Задачи:

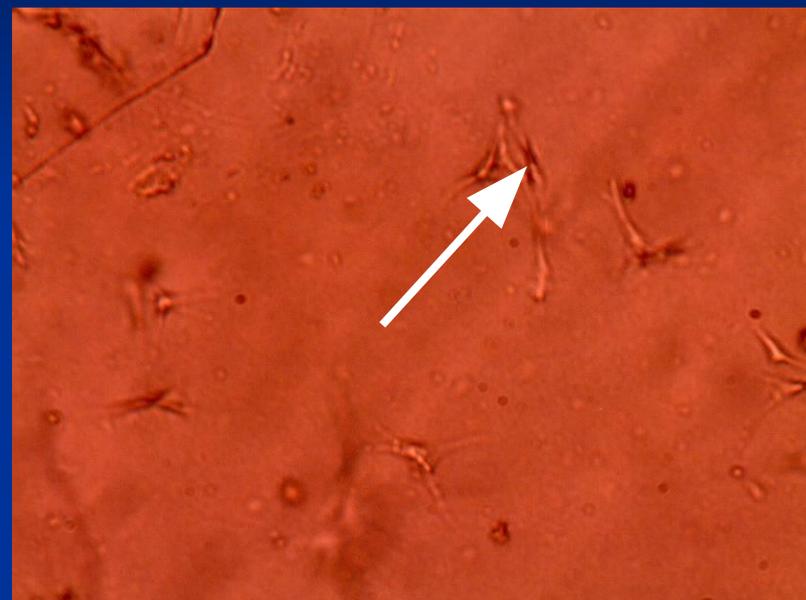
- 1) Создать трёхмерную клеточную конструкцию с использованием гемостатического фибринового средства «Фибриностат», пригодную для предтрансплантационной подготовки клеточного материала.
- 2) Установить морфологические особенности и закономерности пролиферации в окружении фибринового геля мезенхимных стволовых клеток в зависимости от источника (костный мозг, хрящ).
- 3) Изучить динамику экспрессии хондроспецифических маркеров в 3-мерной конструкции в условиях направленной хондрогенной дифференцировки цитохимическими и молекулярно-биологическими методами.



Создание трехмерной клеточной конструкции для предтрансплантационной подготовки клеточного материала.



МСК костного мозга в фибриновом сгустке с концентрацией фибриногена 2 мг/мл



МСК костного мозга в фибриновом сгустке с концентрацией фибриногена 8 мг/мл



Оценка изменения состояния клеток в процессе создания трехмерной конструкции.

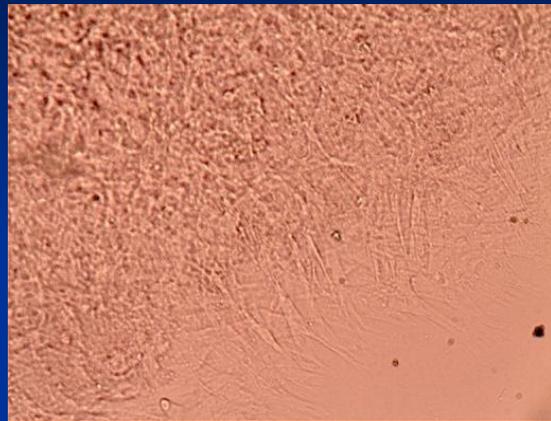
Таблица 1

Восстановление резазурина натриевой соли в процессе метаболической активности клеток.

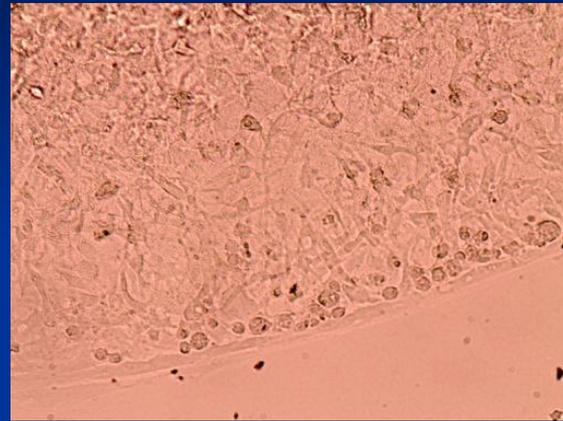
Количество клеток	% восстановления резазурина клетками в сгустке при концентрации фибриногена		
	8 мг/мл	2 мг/мл	0 мг/мл (на пластике)
9000	46±4	<u>64±3</u>	82±2
3000	42±2	50±1	<u>63±4</u>
1000	37±4	42±2	46±2



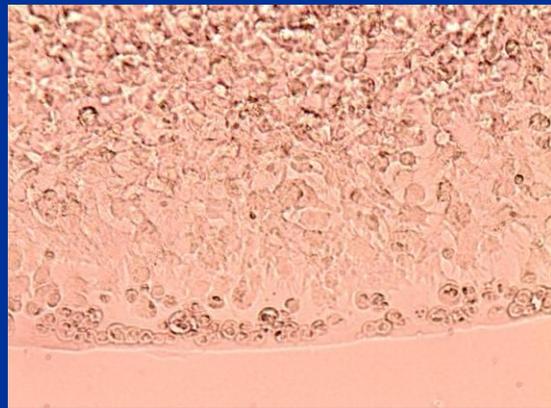
Оценка способности МСК в фибриновом сгустке дифференцироваться в хондрогенном направлении.



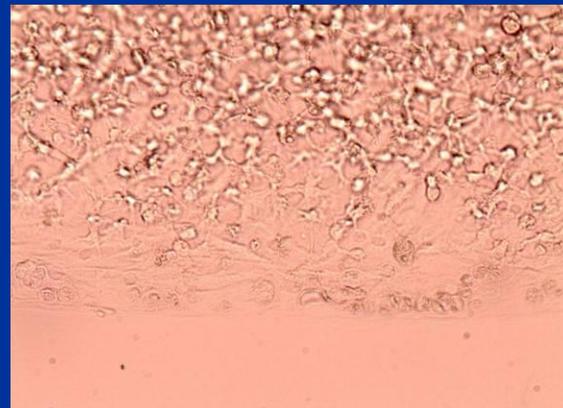
А



Б



В

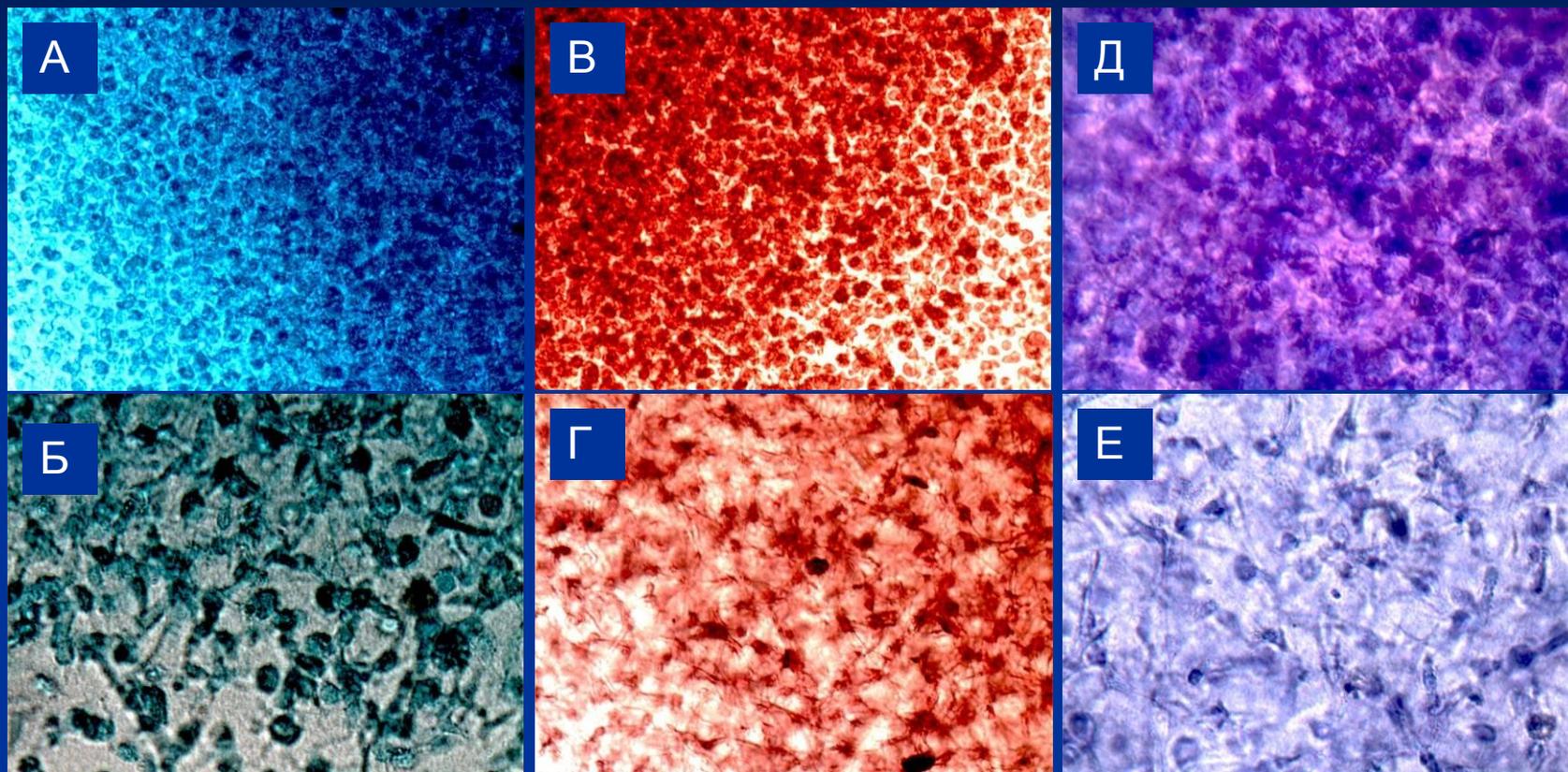


Г

МСК в фибриновом сгустке:
1) с концентрацией фибриногена 2 мг/мл: А - опыт, Б - контроль;
2) с концентрацией фибриногена 8 мг/мл: В - опыт, Г - контроль



Гистохимическое подтверждение дифференцировки МСК в хондрогенном направлении.



МСК, выделенные в фибриновом сгустке 8 мг/мл: 1) окраска альциановым синим: А – опыт, Б – контроль, 2) окраска сафранином О: В – опыт, Г – контроль; 3) окраска толуидиновым синим: Д – опыт, Е – контроль.



Подтверждение синтеза клетками кислых гликозаминогликанов – одних из основных продуктов хондроцитов.



МСК в фибриновом сгустке:
верхний ряд
окраска сафранином O,
нижний ряд
окраска толуидиновым синим;
слева – опыт (дифференцировка
в хондрогенном направлении, 7
дней),
справа – контроль.



Определение жизнеспособности клеток в процессе дифференцировки по включению натриевой соли резазурина.

Таблица 2

Поглощение экстрагированного красителя толуидинового синего из опытных и контрольных образцов МСК КМ на 7 день дифференцировки.

	Поглощение (длина волны 630 нм) экстрагированного красителя (ед.опт. пл.) из сгустков с разной концентрацией фибриногена	
	2 мг/мл	8 мг/мл
Опыт	0,149±0,007	0,215±0,015
Контроль	0,054±0,01	0,078±0,008

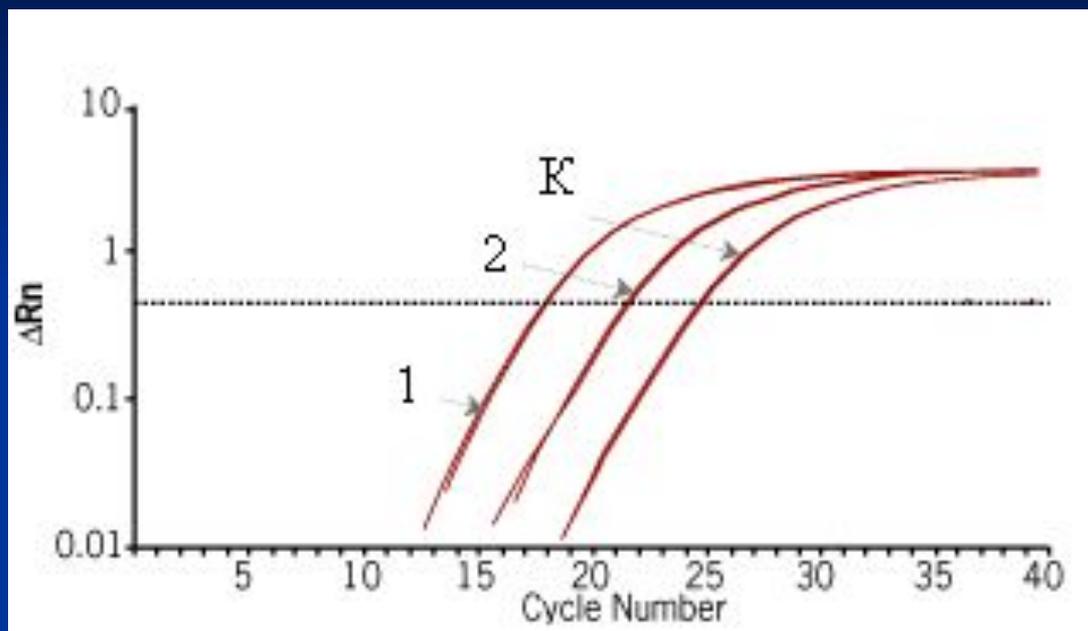
Определение жизнеспособности клеток в процессе дифференцировки по включению натриевой соли резазурина.

Таблица 3

Процент редукции клетками натриевой соли резазурина.

Сгусток с концентрацией фибриногена	Эксперимент	Редукции красителя, %
8 мг/мл	Опыт	23±1,6
	Контроль	26±1,5
2 мг/мл	Опыт	41±2,0
	Контроль	50±3,1

Количественное определение агрекана с помощью RT-PCR.



Амплификация кДНК гена агрекана (ACAN) в разных клетках:

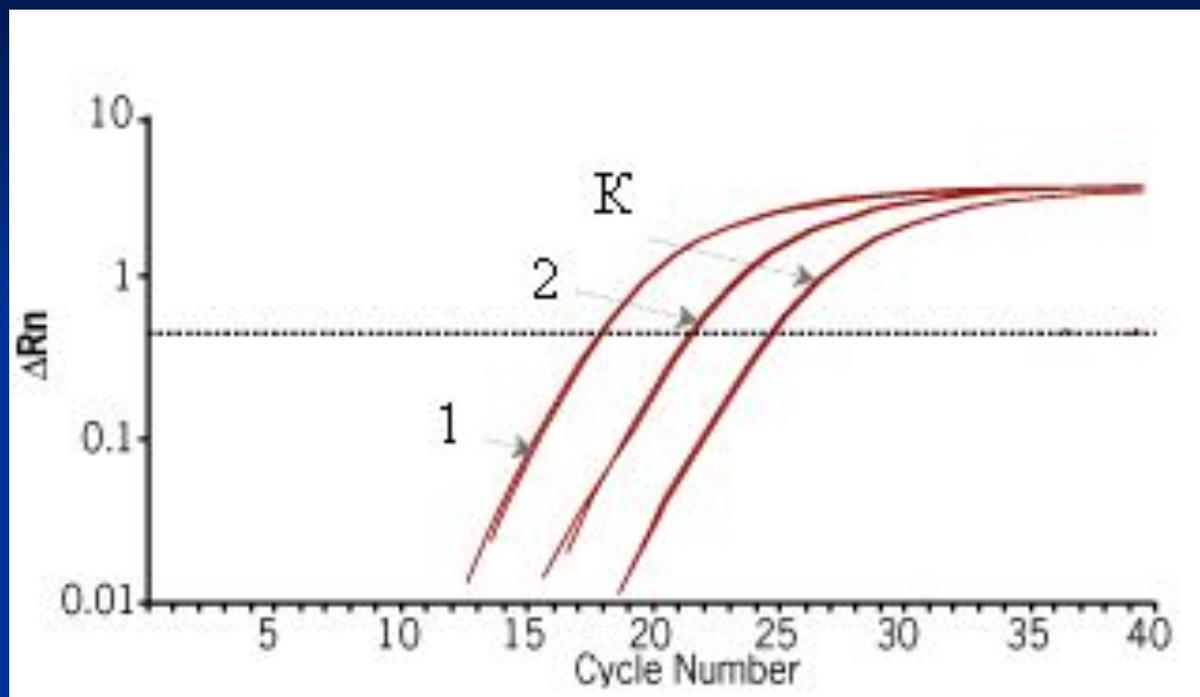
К– контроль (МСК);

1 – хондроциты;

2 – МСК, прошедшие дифференцировку в хондрогенном направлении в фибриновом геле.



Количественное определение коллагена II типа с помощью RT-PCR.



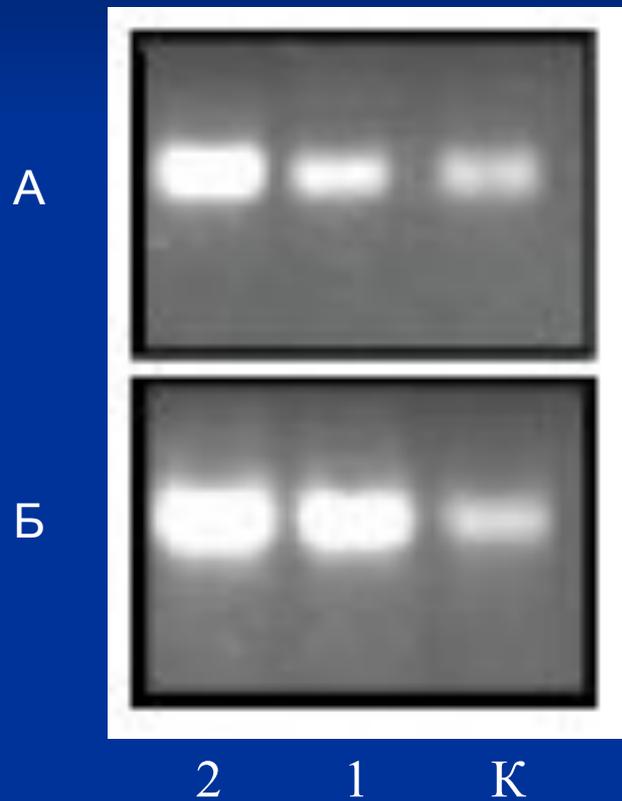
Амплификация кДНК гена коллагена II типа (COL1A1) в разных клетках:

К– контроль (МСК);

1 – хондроциты;

2 – МСК, прошедшие дифференцировку в хондрогенном направлении в фибриновом геле.

Выявление наличия агрекана и коллагена II типа с помощью электрофореза.



Электрофорез кДНК гена
коллагена II типа (А), агрекана (Б)
в разных клетках:

К– контроль (МСК);

1 – хондроциты;

2 – МСК, прошедшие
дифференцировку в хондрогенном
направлении в фибриновом геле.



Заключение

1. Подобраны оптимальные концентрации компонентов для приготовления фибринового сгустка (аprotинин – 200 Ед/мл, хлорид кальция – 5 мМ, фибриноген – 2 или 8 мг/мл), при длительном культивировании в котором МСК сохраняют свою жизнеспособность.

2. Оценена способность МСК костного мозга и хряща, культивируемых в фибриновом сгустке (2 и 8 мг/мл фибриногена), дифференцироваться в хондрогенном направлении.

3. Подтверждена дифференцировка МСК в хондрогенном направлении:
- по изменению морфологии клеток (гистохимическое окрашивание);
- по накоплению протеогликанов (гистохимические методы окраски толуидиновым синим, альциановым синим и сафранином O).

Различия между опытными и контрольными образцами также подтверждены количественно колориметрическим методом, RT-PCR и электрофорезом.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования сгустка на основе фибриногена и тромбина как материала для переноса клеточных культур в организм. Однако внедрение в клиническую практику требует дальнейшего продолжения исследований по подбору оптимальных условий культивирования и дифференцировки клеток в необходимом направлении.



Спасибо
за внимание!