

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

16 марта 2010 г.

Регистрационный № 064-0610

**АЛГОРИТМ ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Кондрачук А.Н.

канд. мед. наук Воропаев Е.В.

канд. мед. наук, доц., Николаев В.И.

Гуреев С.А.

Гомель 2010

В настоящее время с точки зрения практического применения в медицине большой интерес представляет изучение свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК), основными источниками которых являются костный мозг, жировая ткань, пуповинная кровь. Эти клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом и широкой пластичностью при выборе путей дифференцировки. Установлено, что мезенхимальные стволовые клетки, присутствующие во взрослом костном мозге, могут пролиферировать как недифференцированные клетки. Они имеют фибробластоподобный фенотип в культуре и образуют монослой, обладают способностью дифференцироваться в ткани мезенхимального происхождения: кость, хрящ, жировую, мышечную ткани, а также дают начало клеткам стромы красного костного мозга.

Одной из актуальных проблем современной медицины, в частности ортопедии, остаются дегенеративные заболевания хрящевой ткани суставов. Несмотря на способность к репарации хрящевая ткань в силу ряда причин, не в состоянии полностью устранить дефицит функциональных единиц, возникающий в результате действия повреждающих факторов. Биологическая уязвимость хрящевой ткани определяется неспособностью самовосстанавливаться после травмирующих воздействий или в течение патологических изменений сустава вследствие низкого содержания резидентных прогениторных клеток — хондробластов.

Так как высокодифференцированные клетки хрящевой ткани — хондроциты — не размножаются, то для разработки методов реконструктивного лечения суставов с использованием тканеспецифичных клеток необходимо применять биологически более активные клетки — хондробласты, обладающие пролиферативной активностью и полученные путем направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток.

Перечень необходимого оборудования и материалов

Лабораторное оборудование, применяемое при работе со стволовыми клетками, должно позволять проводить все необходимые этапы, начиная с выделения МСК из биологического материала и культивирования, а так же

направленную дифференцировку МСК с дальнейшим анализом полученной культуры методом ПЦР в реальном времени.

Таблица 1

Оптимальный набор оборудования

Наименование оборудования и основные характеристики	Количество
<i>Выделение, культивирование и направленная дифференцировка МСК</i>	
Ламинарный шкаф II класса биобезопасности	1
Инвертированный микроскоп	1
Световой микроскоп с набором объективов 10х, 40х, 100х	
СО ₂ -инкубатор	1
Центрифуга с охлаждением до 3000 об/мин	1
Вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл, 5–50 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл)	1
Гематологический анализатор	1
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4 °С	1
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 °С	1
<i>Проведение ПЦР в реальном времени</i>	
Термоциклер с функцией флуоресцентной детекции	1
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур от 0 до +25 °С	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл; 5–50 мкл (2 шт.); 20–200 мкл; 100–1000 мкл.)	1
Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от -10 до + 99 °С	1

Перечень необходимых реагентов и расходных материалов:

1. Базовая культуральная среда: DMEM (high glucose); альтернативно: α -MEM; DMEM/Ham-F12.
2. Трансформирующий ростовой фактор TGF- β 3 (либо в комбинации с BMP-6 (bone morphogenetic protein-6)).
3. 1% раствор ITS (инсулин-трансферин-селенит).
4. Пируват Na.
5. Дексаметазон.
6. L-пролин.
7. Аскорбиновая кислота (2-фосфат L-аскорбиновой кислоты).
8. Трипсин-ЭДТА раствор.

9. Тритон-X100.
 10. Коллагеназа типа I.
 11. Раствор антибиотиков-антимикотиков.
 12. L-глутамин.
 13. Фетальная бычья сыворотка (ФБС).
 14. Бычий сывороточный альбумин.
 15. D-PBS (без Ca^{2+} и Mg^{2+}).
 16. Фосфатный буферный раствор (альтернативно — раствор Хэнкса).
 17. Фиколл-вераграфин, плотность 1,077 г/мл.
 18. Гепарин.
 19. Одноразовые полипропиленовые центрифужные пробирки с коническим дном с плотно закрывающимися крышками объемом 10–15 мл.
 20. Одноразовые полипропиленовые конические центрифужные пробирки объемом 50 мл.
 21. Пастеровские пипетки.
 22. Культуральные планшеты и чашки Петри для адгезивных культур.
- Набор расходных материалов и лабораторных аксессуаров: стерильные резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром до 10, 20, 200, 1000 мкл, фильтровальная бумага, ватно-марлевые тампоны, микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого термоциклера, штативы для пробирок, лабораторная пленка — «Parafilm», стеклянная химическая посуда и др.

Показания к применению

Технология, предложенная в разработанной нами инструкции, является наиболее оптимальным лабораторным методом, позволяющим получить культуру мезенхимальных стволовых клеток, провести направленную дифференцировку в хондрогенном направлении и анализ культуры методом RT-PCR по уровню экспрессии маркерных генов. Это является необходимым для верификации дифференцировки полученных клеточных культур. Метод может быть применен в специализированных лабораториях научно-практических центров медицинского профиля для получения адекватных

клеточных культур с последующей трансплантацией как индивидуально, так и в составе биоинженерных конструкций.

Противопоказания для применения

Общие противопоказания к инвазивным исследованиям.

Описание технологии используемого метода

Материал для исследования

Выделение мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга

Получить аспират костного мозга в стерильные пробирки; в качестве антикоагулянта использовать гепарин. Минимально необходимое количество аспирата — 2 мл.

Разбавить образец костного мозга равным объемом фосфатного буфера (раствор Хэнкса) с 2% ФБС.

Осторожно наслоить полученную суспензию на градиент плотности фиколл-верографин (плотность — 1,077г/мл.) в 15-миллилитровые стерильные центрифужные пробирки в соотношении суспензия-градиент 2:1 (например, 4 мл суспензии на 2 мл градиента).

Центрифугировать при 1200 rpm (330 g) 25 мин.

Осторожно собрать полученное интерфазное кольцо, содержащее моноклеарные клетки в стерильные 15-миллиметровые центрифужные пробирки.

Клетки разбавить 5-кратным объемом фосфатного буфера (раствор Хэнкса) с 2% ФБС. Центрифугировать при 1200 rpm (330 g) в течение 7–10 мин.

Ресуспендировать клеточный осадок и повторить процедуру отмывки.

Подсчитать количество клеток, используя гематологический анализатор или камеру Горяева.

Выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани

Для получения необходимого количества клеток достаточно 2–3 мл липоаспирата. Полученный липоаспират смешать с равным объемом

стерильного фосфатного буфера (раствор Хэнкса). При необходимости ткань можно гомогенизировать.

Центрифугировать суспензию при 2000–2500 rpm в течение 7–10 мин.

Образовавшийся поверх фосфатного буфера супернатант отбирается в отдельную стерильную пробирку. Процедуру отмывки повторить.

Полученную после отмывки суспензию смешать с равным объемом 0,075% раствором коллагеназы I типа. Инкубировать в течение 30–60 мин. при 37°C (в термостате) при периодическом (каждые 10–15 мин.) легком помешивании.

Для нейтрализации фермента добавить к смеси равный объем фосфатного буфера (раствор Хэнкса) с 10% ФБС. Центрифугировать при 1200 rpm (330 g) 10 мин.

Отобрать и удалить супернатант, оставляя примерно 1–2 мл. осадка. Добавить 8–10 мл фосфатного буфера (раствор Хэнкса) с 10% ФБС. Центрифугировать кратковременно в течение 10 с при 1200 rpm (330 g).

Полученная суспензия клеток осторожно собирается в стерильную пробирку и отмывается с 10–15 мл раствора Хэнкса с 2% ФБС, путем центрифугирования в течение 7 мин при скорости 1000 rpm. Процедуру отмывки повторяют дважды.

Отобрать супернатант в новую стерильную пробирку. Оставшийся осадок удаляется.

Отмыть полученную клеточную суспензию, добавив 8–10 мл фосфатного буфера (раствор Хэнкса) с 10% ФБС. После максимально возможного удаления супернатанта объем клеточной суспензии доводится до 1–2 мл.

Подсчитать количество клеток, используя гематологический анализатор или камеру Горяева.

Культивирование мезенхимальных стволовых клеток

Приготовить суспензию моноклеарных клеток в полной культуральной среде в концентрации 10^7 клеток/мл. Приготовление полной

культуральной среды: к базовой среде DMEM добавить ФБС в конечной концентрации 10%; L-глутамин в конечной концентрации 2 mM; смесь антибиотиков в конечной концентрации: пенициллин 100 U/ml, стрептомицин 100 µg/ml, неомицин 0,25 µg/ml.

Добавить по 9 мл полной культуральной среды в расчете на 1 флакон площадью 25 см² (T-25).

Внести во флаконы со средой подготовленную клеточную суспензию в концентрации 10⁷ клеток/мл. в объеме 1 мл.

Плотно закрыть крышку; осторожно покачивая флакон, перемешать среду для равномерного распределения клеток по поверхности флакона. Избегать попадания среды на горлышко флакона (с целью уменьшения риска контаминации культуры)!

Инкубировать культуру при 37°C в CO₂-инкубаторе, в атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажностью.

Через 24 ч среду полностью заменяют на новую ростовую среду для удаления клеток, находящихся во взвешенном состоянии.

Далее в процессе культивирования среду меняют через каждые 3–4 дня. Длительность культивирования составляет около 1 мес (два пассажа, примерно по 14 дней каждый). На протяжении всего периода проводится морфологическая оценка состояния нативной клеточной культуры с помощью инвертированного микроскопа, при заменах культуральной среды, в течение 1 мес.

При достижении 70–80% покрытия поверхности флакона прикрепленными клетками культура отмывается дважды фосфатным раствором Dulbecco без Mg²⁺ и Ca²⁺ (D-PBS) или фосфатным буфером (без фетальной бычьей сыворотки).

Для дальнейшей направленной дифференцировки клетки снимаются с поверхности пластика при помощи 0,25% раствора трипсин-ЭДТА. Для этого следует:

- добавить 5 мл. заранее нагретого до 37°C раствора трипсин-ЭДТА в каждый флакон, инкубировать 3–5 мин. при 37°C.
- для нейтрализации действия фермента добавить в каждый флакон по 2,5 мл. ФБС.
- перенести клеточную суспензию в 15-миллиметровые пробирки и центрифугировать при 1200 rpm (330 g) 5–7 мин.

Удалить супернатант, клеточный осадок ресуспендировать в 1–2 мл полной культуральной среды и поместить в холодильник на +4°C.

Направленная хондрогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток

Культуральная среда: 95% DMEM-high glucose, 1% раствор 1x ITS plus, 1% раствор антибиотиков, 100 µg/ml sodium pyruvate, 50 µg/ml 2-фосфат L-аскорбиновой кислоты (AsAP), 40 µg/ml L-пролина, 0,1 µM дексаметазона, 10 ng/ml рекомбинантного человеческого TGF-β₃.

Клетки однократно отмываются D-PBS и ресуспендируются в 1 мл полной культуральной среды для подсчета концентрации.

Перенести ~400000 клеток в 500 мкл полной культуральной среды с ростовыми факторами в 15-миллилитровые конические полипропиленовые пробирки.

Центрифугировать при скорости 450g и температуре 4°C в течение 10 мин. После центрифугирования пробирки поместить в CO₂-инкубатор. Непосредственно перед помещением в инкубатор приоткрыть пробки пробирок отвинчиванием на 0,5 оборота для обеспечения поступления CO₂.

Культивировать в течение 14 дней при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажностью.

Замену среды с добавлением свежеприготовленного TGF-β₃ производить каждые 3–4 дня, путем осторожного аспирирования надосадочной жидкости, не затрагивая клеточный осадок.

После культивирования и дифференцировки для анализа экспрессии маркерных генов, а также проведения гистологических и/или биохимических

исследований перевернуть пробирку и осторожно вытряхнуть осадочную (гранулярную) культуру. Диаметр клеточной «гранулы» как правило составляет 2-4 мм.

а) использовать 1% Тритон-Х100 для диссоциации клеточного осадка при проведении количественных биохимических анализов (определение коллагена, протеогликана и др.).

б) для гистологических исследований образцы могут быть дегидротированы, залиты в парафин и прокрашены для получения срезов по стандартным методикам (окрашивание толуидином и сафранином О для идентификации сульфатированных протеогликанов).

Проведение обратной транскрипции и ПЦР

Для определения уровня дифференцировки культивированных клеток используется определение уровней экспрессии генов Col2a1, aggrecan, COMP и Sox9 методом ПЦР в реальном времени, основанным на протоколе SybrGreen.

Контроль качества экспрессии проводится на основании анализа кривых плавления (Melt Curve Analysis): результаты с димерами праймеров исключаются из анализа данных.

В качестве негативного контроля дифференцировки анализируется культура МСК, выращенная без индукторов.

В качестве положительного контроля дифференцировки целесообразно использовать хрящевую ткань человека.

В качестве контроля специфичности работы праймеров возможно использовать стандартизованную РНК здорового человека.

Выделение суммарной РНК человека из крови и получение препаратов кДНК из образцов мРНК проводится с помощью специализированных комплектов реагентов согласно прилагаемой инструкции производителя.

Контроль качества выделения РНК проводится спектрофотометрически.

Нормализация уровней экспрессии проводится по β -актину.

Для молекулярно-генетической характеристики клеток используются праймеры к следующим маркерам, специфичным для хрящевой ткани (табл. 2):

Таблица 2

Структура праймеров, используемых для оценки уровня экспрессии генов маркерных белков, специфичных для хрящевой ткани

Название локуса	Нуклеотидная последовательность
Collagen II (COL2A1)	F5'-GGCAATAGCAGGTTACGTACA-3'
	R5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACTT-3'
aggrecan	F5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3'
	R5'-TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA-3'
Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)	F5'-CCGACAGCAACGTGGTCTT-3'
	R5'-CAGGTTGGCCCAGATGATG-3'
SOX9	F5'-GACTTCCGCGACGTGGAC-3'
	R5'-GTTGGGCGGCAGGTAAGT-3'

Для проверки структуры праймеров используется программа Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Преимущество данной программы над другими on-line программами заключается в проверке комплементарности структуры праймеров, предложенных программой, к имеющимся данным в базе GenBank. Кроме того, проводится анализ и по выявлению наиболее вероятных неспецифических продуктов как внутри генома исследуемого вида, так и в случае смешанных образцов.

ПЦР проводится по следующей программе (табл. 3).

Таблица 3

Программа ПЦР для протокола SybrGreen

Температура	Время	Циклы
95°C	10 мин	1 цикл
95°C	10 с	40 циклов
60°C	15 с	
72°C*	20 с	
Мелтинг — в пределах от 72 до 95°C — сначала 45 с, далее по 5 с при увеличении температуры на 1°C с каждым последующим этапом*.		

* Съем флуоресцентного сигнала по каналу А (FAM/Sybr).

Основные рекомендации по стерильной работе с клеточными культурами

Любые используемые в работе биологические пробы являются потенциально опасным инфицированным материалом!

Работа должна проводиться в лабораторной одежде и в одноразовых перчатках. Обработка одежды из «культуральной» лаборатории производится отдельно. Недопустимо использование лабораторной одежды из других лабораторных помещений или технологических процессов.

Следует использовать отдельно выделенные наборы полуавтоматических пипеток, предназначенные для различных стадий анализа и непереносимые в другие помещения.

Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы должны храниться и использоваться в небольших порциях. Анализируемые образцы следует хранить отдельно от реагентов.

Использованные пробирки и наконечники должны сбрасываться в специальные контейнеры или емкости, содержащие дезинфицирующий раствор (1Н соляная кислота, 10% гипохлорит натрия или 10% хлорная известь).

Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 30 мин до начала работы и в течение 30 мин после ее окончания.