

УДК 619:617.636.087.72:636.2

Волотовский И.Д., доктор биологических наук, академик<sup>1</sup>  
Василевич И.Б., научный сотрудник<sup>1</sup>  
Пинчук С.В., кандидат биологических наук, доцент<sup>1</sup>  
Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>2</sup>  
Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>3</sup>  
Руколь С.А., заведующий лабораторией<sup>4</sup>  
Руколь В.М., доктор ветеринарных наук, профессор<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>РДУП «Опытная научная станция по птицеводству», г. Заславль, Республика Беларусь

<sup>4</sup>УЗ «Витебский областной клинический онкологический диспансер», г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>5</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

### Резюме

Отработана методика выделения из жировой ткани крупного рогатого скота мезенхимальных стволовых клеток с характерным фено- и иммунотипом. Результаты исследований показывают, что жировая ткань (ЖТ) крупного рогатого скота (КРС) представляет собой источник мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которые могут быть использованы в ветеринарной медицине.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, культивирование клеток, точная цитометрия, иммунофенотип клеток.

### Summary

A technique has been developed for isolating mesenchymal stem cells with a characteristic pheno- and immunotype from the adipose tissue of cattle. Research results show that adipose tissue (AT) of cattle is a source of mesenchymal stem cells (MSCs) that can be used in veterinary medicine.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, adipose tissue, cell cultivation, flow cytometry, cell immunophenotype.

Поступила в редакцию 30.10.2024 г.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы все более широкое распространение получают прикладные биомедицинские исследования, связанные с использованием мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) [2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13].

Клеточные технологии с использованием МСК являются перспективными в разрешении проблемы лечения заболеваний КРС. Хирургические болезни крайне негативно сказываются на здоровье животных и их продуктивности [1, 10].

Безопасность применения клеточных технологий подтверждена многочисленными работами ученых, разрабатывающих методы лечения болезней человека и животных стволовыми клетками [2, 3, 4, 6].

Терапия стволовыми клетками наиболее эффективна в фибробластической (пролиферативной) фазе заживления тканей. Стволовые клетки успешно использовались во время острой воспалительной стадии, модулируя также местный Т-клеточно-опосредованный иммунологический ответ и усиливая регенерацию тканей [3, 5, 6, 13, 17].

В ветеринарной медицине также изучаются возможности применения МСК для лечения сельскохозяйственных и домашних животных. Достоверно установлено, что данные клетки обладают способностью самообновляться *in vitro* без анеуплоидии, генетической нестабильности и малигнизации, пролиферируются в культуре клеток, при индукции направленной диф-

ференцировки они формируют *in vitro* клетки других тканей, что делает их уникальным исходным материалом для создания в сельскохозяйственной биотехнологии новых клеточных систем и продуктов. Имеющиеся к настоящему времени многочисленные данные указывают на то, что МСК секретируют паракринные факторы, которые играют ключевую роль при терапии многочисленных острых и хронических болезней у различных видов животных, в том числе и крупного рогатого скота [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17].

МСК содержатся во всех тканях, где они самообновляются и дифференцируются во множество клеточных типов.

Известно, что для терапевтического действия в области органа-мишени возможно применение клеток, полученных из источников различной локализации. Для использования в терапевтических целях МСК выделяют из жировой ткани или костного мозга [3, 5, 6, 7, 11, 16, 17].

Однако из ЖТ можно выделить в 500 раз больше клеток, чем из костного мозга [2, 5, 7]. В целом считается, что терапевтический эффект может быть достигнут вне зависимости от анатомической локализации биоптата ЖТ [2, 5, 17].

Благодаря своей способности дифференцироваться в различные ткани, МСК могут применяться для лечения значительного количества заболеваний.

Таким образом, всестороннее изучение МСК, а также их выделение и культивирование является одной из актуальных и перспективных задач современной ветеринарной медицины.

**Цель** настоящих исследований – выделение, культивирование, идентификация, характеристика функционального состояния мезенхимальных стволовых клеток и их предшественников из жировой ткани крупного рогатого скота.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали лабораторное поверенное оборудование: ламинарный бокс Labconco Logic+ (США); газопроточный CO<sub>2</sub>-инкубатор «CO<sub>2</sub>Cell» («МММ», Германия); термостат «Incucell» («МММ», Германия); весы аналитические («Ohaus», Германия); инвертированный микроскоп «Olympus CKX41» («Olympus», Япония), криозамораживатель программи-

руемый «Cryologic CL8800i» («CryoLogic Pty. Ltd.», Австралия), микроцентрифуга «Mini Spin» («Eppendorf», Германия); рН-метр («Radelkis», Венгрия).

В ходе работы были использованы стандартные питательные среды и растворы для работы с клеточными культурами «Рeahим», хч (РФ), и «Sigma-Aldrich», «HyClone» (Великобритания), «Life Technologies» (США), а также антибиотики: пенициллин, стрептомицин, гентамицин, амфотерицин В производства ООО «Биопол» (РФ) и «Biowes» (Франция).

Забор жировой ткани проводили от бычков черно-пестрой породы возраста 16–18 месяцев из благополучных по инфекционным и инвазионным болезням хозяйств в условиях мясокомбината, с соблюдением правил асептики и антисептики. Материал (приблизительно 5–10 см<sup>3</sup> ЖТ) был отобран в течение 30 мин после планового убоя животного стерильными инструментами в стерильную посуду. Отобранный материал помещали в 70%-ный этанол на 30 с, затем депонировали в фосфатно-солевой буфер («Biowest», France) с добавлением 250 МЕ/мл пенициллина, 250 мкг/мл стрептомицина, 32050 МЕ/мл гентамицина сульфата, 2,4 мкг/мл амфотерицина.

Отобранную ткань КРС с целью выделения мезенхимальных жировых стволовых клеток в контейнере при температуре 4 °С в течение 30–40 мин после эксплантации доставляли в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси». Микробиологическую стерильность отобранных образцов оценивали в течение 14 дней визуально на отсутствие изменений в образцах, характерных для контаминации микроорганизмами, а также посевами на питательные среды (МПА, МПБ, Китта-Тароцци и среду Сабуро).

Для выделения МСК ЖТ подвергали ферментативной обработке 0,1%-ным раствором коллагеназы, подогретой до температуры 37 °С в течение 60 мин. Действие коллагеназы нейтрализовали эмбриональной телячьей сывороткой до конечной концентрации 5 %. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при ускорении 370 g в течение 10 мин, удаляли надосадочную жидкость. Осадок, состоящий из стромально-васкулярной фракции, заливали ростовой средой ДМЕМ, содер-

жащей 10 % ЭТС, 2 мМ L-глутамина, 100 МЕ/мл пенициллина, 80 МЕ/мл стрептомицина и 2,4 МЕ/мл амфотерицина.

Клетки подсчитывали в камере Горяева, рассевали в пластиковые культуральные флаконы в концентрации  $10^5$  кл/см<sup>2</sup> и культивировали в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С во влажной атмосфере при постоянном давлении 5 % СО<sub>2</sub>. Проводили смену ростовой питательной среды через 24 ч, а затем – каждые трое суток. Клетки, не прикрепившиеся к пластику, удаляли путем смены питательной среды.

Пересев клеток проводили после достижения сплошного монослоя клеток 95–100 %. Определяли состояние монослоя с помощью микроскопа, после чего монослой промывали ФСБ и вносили 0,25%-ный раствор трипсина в 0,02%-ном растворе ЭДТА, содержащем антибиотики (100 ед/мл пенициллина, 80 мкг/мл стрептомицина и 2,4 мкг/мл амфотерицина), на 1–3 мин до открепления клеток от субстрата при температуре 37 °С. В культуральный флакон с клетками добавляли ростовую питательную среду ДМЕМ, содержащую 3 % ЭТС. Затем клеточную суспензию центрифугировали при 370 g в течение 10 мин, супернатант удаляли, осадок клеток разводили ростовой питательной средой и рассевали в культуральные флаконы на следующий пассаж в количестве  $5 \times 10^3$  кл/см<sup>2</sup>. После 3–4 пассажей клетки характеризовали и криоконсервировали.

Морфологию клеток оценивали в процессе их культивирования методом фазово-контрастной микроскопии (инвертированный микроскоп «Olympus SKX41», Япония). Согласно современным требованиям, границы между клетками должны четко различаться, а сами клетки иметь фибробластоподобную морфологию. Определение жизнеспособности популяции клеток проводили методом подсчета в камере Горяева путем окрашивания абсорбционным красителем трипановым синим, работающим на уровне проницаемости клеточных мембран. Трипановый синий проникает через мембраны мертвых клеток и окрашивает их в синий цвет, в результате чего они отличаются от живых клеток в поле зрения фазово-контрастного микроскопа.

В качестве положительных контролей для характеристики полученных мезенхимальных стволовых клеток из жировой

ткани крупного рогатого скота в исследовании использовались маркеры CD90 и CD44, в качестве отрицательного маркера гемопоэтических клеток – CD45, которые входят в число используемых для МСК КРС.

Анализ полученных культур клеток проводили методом проточной цитометрии. Иммунофенотип МСК определяли с использованием FITC-меченых моноклональных антител к поверхностным маркерам МСК CD44 («Thermo Fisher Scientific», США), CD90 («Novus Bio-Techne Ltd.», США) и маркеру гемопоэтических клеток CD45 («Thermo Fisher Scientific», США) на проточном цитометре «FACSCanto II» («Becton Dickinson», США). Для этого  $10^5$  клеток ресуспендировали в 100 мкл ФСБ с 1 % ЭТС, затем добавляли антитела в разведении согласно инструкции производителя и инкубировали 60 мин с каждым из антител к поверхностным антигенам CD90, CD44 и CD45 в темноте. Далее клетки центрифугировали при 370 g и ресуспендировали в 300 мкл ФСБ для измерения на проточном цитометре. В качестве фонового контроля использовали клетки без добавления антител.

Микробиологическую стерильность выделенных МСК определяли посевом на селективные питательные среды в соответствии с методикой, изложенной в ГФ РБ II, т. 1, п. 5.2.3.

После оценки состояния культуры первичную биомассу МСК замораживали в криопротекторной среде, содержащей 45 % среды ДМЕМ, 45 % ЭТС и 10 % ДМСО. Клетки снимали с пластика и подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике. Разливали по аликвотам и помещали криобирки в программируемый криозамораживатель «Cryologic CL8800i», где образцы выдерживались при температуре 5,5 °С в течение 10 мин, далее охлаждались до температуры минус 120 °С со скоростью 1 °С в мин. С целью хранения клетки помещались в сосуды Дьюара с жидким азотом.

Клетки в суспензии имели округлую форму, при посеве на культуральный флакон с ростовой питательной средой во время формирования монослоя приобретали веретенообразную мультиполярную (фибробластоподобную) морфологию и через 48 ч хорошо распределялись на культу-

ральной поверхности. Культуры клеток трансплантатов тестировали на соответствие параметрам жизнеспособности (более 90 % жизнеспособных клеток), иммунофенотипа (CD90 и CD44 – более 90 %, CD45 – менее 3 %) и стерильности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Отобранная ЖТ КРС после обеззараживания поверхности отобранного биоптата в 70%-ном этиловом спирте (30 с) оставалась стерильной, при этом сохранилась функциональность полученного биоматериала.

*In situ* прогениторные клетки жировой ткани заключены в плотный внеклеточный матрикс и располагаются в стенках кровоснабжающих ее капилляров и артериол. Жировую ткань обрабатывали коллагеназой. Было установлено, что использование 0,1%-ной коллагеназы в течение 120 мин привело к дезагрегации жировой ткани и выходу клеток в среду, при этом количество жизнеспособных клеток составляло более 90 %.

Способ получения ЖТ-МСК КРС заключался в выделении стромально-сосудистой фракции и отборе этих клеток при последующем культивировании за счет их способности адгезироваться на субстрате и сохранять способность к делению. Изучение морфологии культивируемых клеток из жировой ткани крупного рогатого скота показало, что в течение 10 дней культивирования клетки, адгезированные к культуральной поверхности, имели как веретенообразную, так и округлую или неправильную форму (рисунок 1). На рисунке 1 фибробластоподобные клетки находятся в лог-фазе, культура не конфлюэнтна, клетки равномерно распределены по культуральной поверхности и беспорядоч-

но ориентированы. Сначала, примерно на 5-е сутки, в культуре появлялись удлиненные клетки, некоторые из них имели треугольную или многоугольную форму, размером более 40 мкм и с крупными ядрами. Клетки располагались на большом расстоянии друг от друга. Примерно на 10-й день роста культуры в клетках была отчетливо видна гомогенная цитоплазма и ядра с ядрышком. Размер этих клеток варьировался от 20 до 40 мкм, они делились и начинали образовывать колонии. Через 15 дней и более в культуре преобладали веретенообразные клетки. Примерно на 20-й день культивирования наблюдалась тенденция к образованию монослоя клеток со слиянием 80 %. После 2-кратного пассирования культура АТ-МСС была представлена в основном однородной популяцией веретенообразных фибробластоподобных клеток мультиполярной формы. Клетки в конфлюэнтном слое были биполярны с образованием характерных параллельных решеток и завитков. В полученных клетках отсутствовала грануляция и вакуоли вокруг ядра, это свидетельствовало о здоровой культуре (рисунок 2).

На рисунке 3 видны маркеры CD90, CD44, характерные для МСК, CD 45 – маркер гемопоэтических клеток, характеризующий гомогенность препарата МСК.

Полученная культура МСК жировой ткани КРС была представлена в основном гомогенной популяцией фибробластоподобных веретеновидных клеток. Анализ иммунофенотипа культуры клеток показал высокое содержание клеток, экспрессирующих такие гликопротеины, как CD44 и CD90 (90–95 %), и низкий процент клеток, экспрессирующих CD45 (0,8–1,2 %), что соответствует критериям чистоты культуры МСК.

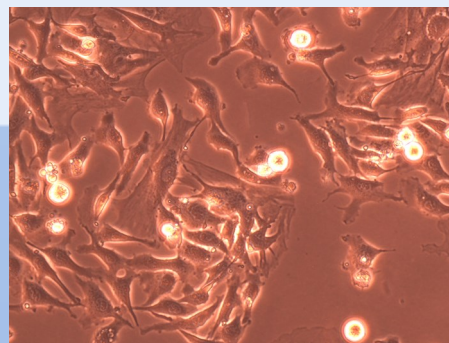
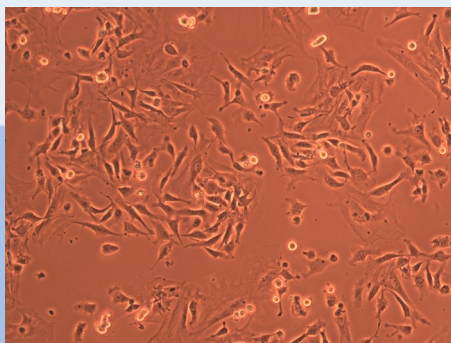
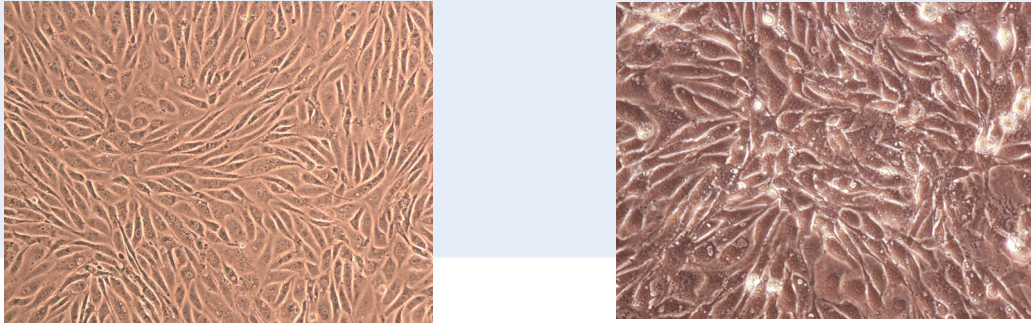
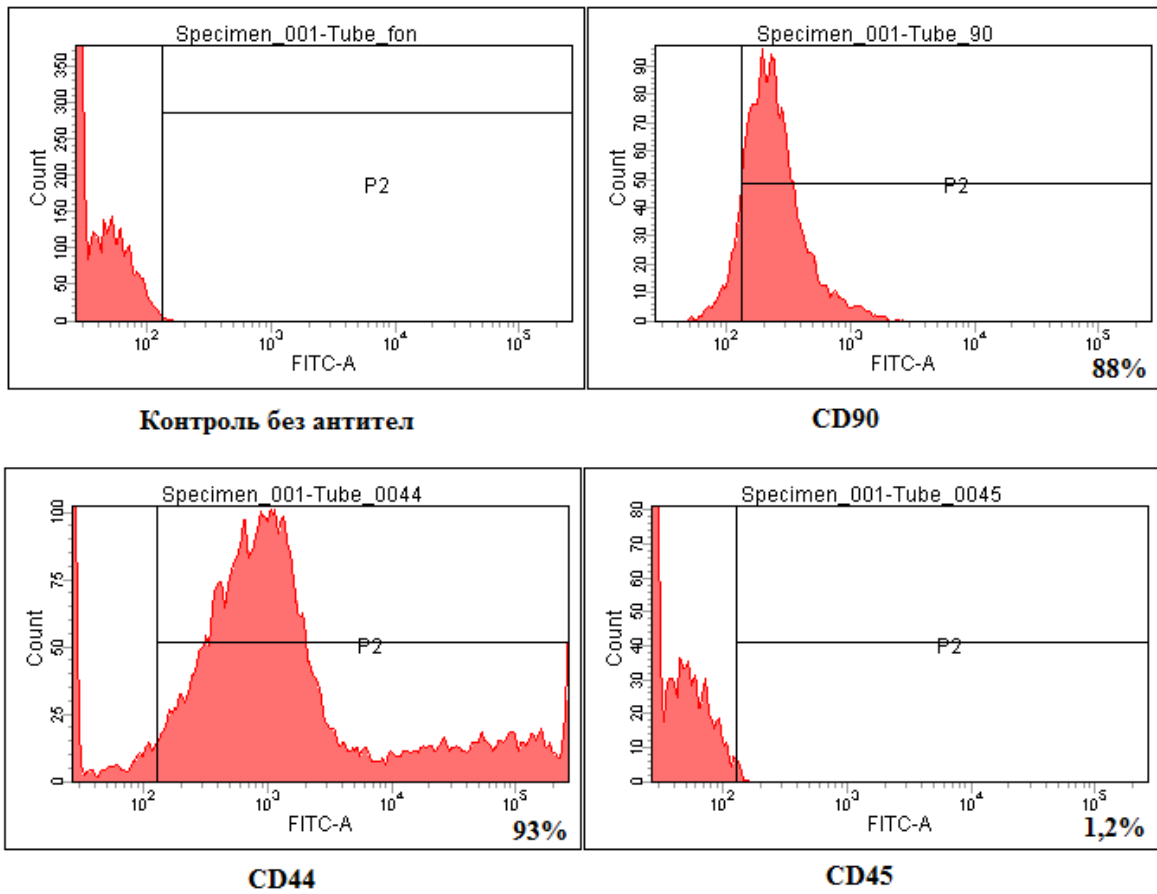


Рисунок 1 – Морфология культивируемых клеток МСК из жировой ткани крупного рогатого скота, лог-фаза. Фазовый контраст, слева  $\times 100$ , справа  $\times 200$



**Рисунок 2 – Клетки МСК в конце лог-фазы и переход на стадию плато. Монослой клеток перед трипсинизацией. Фазовый контраст, слева ×100, справа ×200**



**Рисунок 3 – Результат типичного эксперимента по иммунофенотипированию клеток с использованием меченых антител к мезенхимальным и гемопоэтическим поверхностным маркерам**

Таким образом, МСК, полученные из жировой ткани КРС, имели типичную морфологию, стабильный иммунофенотип, высокую пролиферативную активность и жизнеспособность (более 90 %). При дальнейшем исследовании эти характеристики МСК не изменялись (рисунок 3).

Замораживание МСК КРС в криопротекторной среде и хранение при температу-

ре жидкого азота показало, что они хорошо переносят процедуру криоконсервации, что, в свою очередь, позволяет рассматривать данные клетки как объект для банкирования. После размораживания криоконсервированных МСК количество жизнеспособных клеток варьировалось в диапазоне 80–87 %. Криоконсервированные МСК сохраняли способность к адгезии и

при посеве формировали монослой фибробластоподобных веретеневидных клеток. Окрашивание МСК КРС мечеными флуорохромом антителами показало сохранение иммунофенотипа клеток после криоконсервации. Количество клеток, экспрессирующих CD44 и CD90, оставалось на уровне более 90 %, роста количества клеток, экспрессирующих маркер гемопоетических клеток, не наблюдалось. Следует отметить, такое поведение (высокий процент жизнеспособных клеток после размораживания, сохранение способности к адгезии и стабильность иммунофенотипа) характерно для МСК, выделенных из жировой ткани человека [18].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отличие от эксплантации тканей человека, а также мелких лабораторных животных, когда отбор материала можно произвести в стерильных операционных, эксплантацию ЖТ КРС осуществляли в убойном цеху мясокомбината, то есть в условиях повышенного риска контаминации биоптатов микроорганизмами. Однако общепринятые меры по обеспечению стерильности (стерильность инструментов, прижигание места разреза, помещение извлеченных кусочков ткани на 20–30 с в 70%-ный этанол, добавление антибиотиков в среды для биоптатов) оказались достаточными для получения материала, удовлетворяющего требованиям стерильности и функциональности для выделения мезенхимальных стволовых клеток.

Определены оптимальные условия обработки жировой ткани КРС в растворе коллагеназы, обеспечивающие получение стромально-васкулярной фракции, содержащей более 90 % жизнеспособных клеток.

В результате изучения морфологии культивированных клеток, стромально-васкулярной фракции из ЖТ КРС показано, что в сроки культивирования до 10 суток адгезировавшие к культуральному пластику клетки имели как веретеневидную, так и округлую или неправильную форму, а на сроках более 15 суток в культуре преобладали фибробластоподобные клетки веретеневидной формы. При иммунофенотипировании клеток к маркерам, специфичным для МСК, анализ показал высокое содержание клеток, экспрессирующих гликопротеины CD44 и CD90 (90–95 %), и низкий процент клеток, экспрессирующих гликопротеины CD45 (0,8–1,2 %), что соответствует критериям подлинности для МСК.

Полученные экспериментальные данные подтверждают, что выделенные нами популяции клеток обладают биологическими свойствами, характерными для МСК в культуре *in vitro*.

Таким образом, клетки, выделенные нами из жировой ткани крупного рогатого скота, представляют собой мезенхимные стволовые клетки. Наши исследования продемонстрировали, что эти клетки являются материалом для развития приоритетных направлений исследований в ветеринарной медицине и сельскохозяйственной биотехнологии.

### СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Болезни конечностей у коров в условиях молочных комплексов, профилактика, лечение / А. Н. Елисеев, С. М. Коломийцев, А. И. Бледнов, В. А. Толкачёв // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 9. – С. 124–132.
2. Волотовский, И. Д. Стволовые клетки: перспективы развития клеточных технологий / И. Д. Волотовский, Е. С. Лобанок, Е. Н. Лойко // Наука и инновации. – 2011. – № 1 (95). – С. 17.
3. Клинические возможности применения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани при лечении пациентов с трофическими язвами нижних конечностей / Е. В. Баранов, С. И. Третьяк, И. Б. Василевич [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. VIII, № 2. – С. 78–83.
4. Кривенко, С. И. Опыт и перспективы клинического применения мезенхимальных стволовых клеток / С. И. Кривенко, А. Л. Усс, Н. И. Дедюля // Актуальные вопросы гематологии: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, 15-16 сент. 2011 г., г. Гомель / Гомел. гос. мед. ун-т; гл. ред. А.Н. Лызигов; ред. Н. Н. Климкович [и др.]. // Проблемы здоровья и экологии. – 2011. – № 2. – С. 51–54.
5. Локальная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и фибробластов кожи: особенности регенерации кожного покрова и сравнительная оцен-

ка показателей заживления экспериментальных раневых дефектов / Е. В. Баранов [и др.] // Военная медицина. – 2017. – № 2. – С. 79–86.

6. Морфологические признаки эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в комплексном лечении длительно незаживающих инфицированных ран в эксперименте / В. Я. Третьяк [и др.] // Военная медицина. – 2012. – № 1. – С. 122–124.

7. Особенности регенерации кожного покрова при применении мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани у лабораторных животных с дефектом мягких тканей / Х. А. Сахаб [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – № 2. – С. 134–139.

8. Петренко, А. Ю. Трансплантация стволовых клеток – перспективное направление терапии 21 века. 2. Стволовые клеточные клетки из разных источников / А. Ю. Петренко, В. И. Грищенко // Международный медицинский журнал. – 2003. – Т. 9, № 1. – С. 123–129.

9. Петренко, А. Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / А. Ю. Петренко, Ю. А. Хуанов, Э. Н. Иванов. – Луганск : Пресс-Экспресс, 2011. – 368 с.

10. Руколь, В. М. Болезни конечностей у крупного рогатого скота в условиях интенсификации молочного скотоводства: монография / В. М. Руколь, В. А. Журба. – Витебск : ВГАВМ, 2022. – 368 с.

11. Сахаб, Хайдар А. Противовоспалительный эффект мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани при лечении инфицированных ран в эксперименте / Хайдар А. Сахаб, С. И. Третьяк, Е. В. Баранов // Медицинский журнал. – 2012. – С. 77–81.

12. Estimating the value of infectious or noninfectious foot disorder prevention strategies within dairy farms, as influenced by foot disorder incidence rates and prevention effectiveness / K. A. Dolecheck [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2019. – Jan. – Vol. 102, is. 1. – P. 731–741.

13. Fortier, L. A. Stem cells in veterinary medicine / L. A. Fortier, A. J. Travis // Stem Cell Res. Ther. – 2011. – V. 2. – P. 9.

14. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species / A.B.T. Hill [et al.] // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – V. 10. – P. 44.

15. Fortier, L. A. Stem cells in veterinary medicine / L. A. Fortier // Stem Cell Res. Ther. – 2011. – Vol. 2. – P. 9.

16. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system / T. C. Cardoso, H. F. Ferrari, A. F. Garcia [et al.] // BMC Biotechnol. – 2012. – Vol. 12. – P. 12–18.

17. Bernardo, M. E. Mesenchymal stromal cells / M. E. Bernardo, F. Locatelli, W. E. Fibbe // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2009. – Vol. 1176. – P. 101–117.

18. Криоконсервация стволовых клеток: практические аспекты и преимущества / С. В. Пинчук, Л. В. Дубовская, Г. М. Загородный, И. Д. Волотовский // Прикладная спортивная наука. – 2017. – № 1 (5). – С. 105–112.

**ТРИКЛАМИЗОЛ**  
противопаразитарный препарат

**СОДЕРЖИТ**  
триклабендазол,  
албендазол,  
левамизола  
гидрохлорид,  
лактозу

**ПРИМЕНЯЮТ**  
при ассоциативных  
гельминтозах крупного  
рогатого скота и  
диких парнокопытных  
животных групповым  
способом с кормом или  
подкормкой однократно

**WWW.BIEVM.BY**