

hippocampus./ Kato K., Shimazaki K., Kamiya T.[et al.]//Life Sciences. – 2005. – Vol. 77, №23. – P. 2867–2878.

9. Kip S. Changes in the expression of plasma membrane calcium extrusion systems during the maturation of hippocampal neurons./ Kip S., Gray N., Burette A. [et al.]//Hippocampus. – 2006. – Vol.16, №1. – P. 20–34.

10. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia./Kirino T.//Brain Res. –1982. – Vol. 239, № 1. – P. 57–69.

11. Larsen G. Endoplasmic reticulum dysfunction and Ca²⁺ deregulation in isolated CA1 neurons during oxygen and glucose deprivation./ Larsen G., Skjellegrind H., Moe M.[et al.]//Neurochemical Research. –2005. – Vol.30, № 5. – P. 651–659.

12. Lehotsky J. Distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump (PMCA) isoforms in the gerbil brain: effect of ischemia-reperfusion injury./ Lehotsky J., Kaplan P., Racay P.[et al.]//Neurochemistry International. – 1999. – Vol.35, № 3. – P. 221–227.

13. Lehotský, J. Plasma membrane Ca²⁺-pump functional specialization in the brain – Complex of isoform expression and regulation by effectors./ Lehotský, J.//Molecular and Chemical Neuropathology. – 1995. – Vol.25. – P. 175–187.

14. Lytton J. Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase./ Lytton J., Zarain-Herzberg, Periasamy M.[et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1989. – Vol. 264, №12. – P. 7059–7065.

15. Miller K. Localization of an endoplasmic reticulum calcium ATPase mRNA in rat brain by in situ hybridization./ MillerK., Verma A., SnyderS. [et al.]//Neuroscience. – 1991. – Vol. 43, № 1. – P. 1–9.

16. Mironov S. Plasmalemmal and intracellular Ca²⁺ pumps as main determinants of slow Ca²⁺ buffering in rat hippocampal neurones./ Mironov S.//Neuropharmacology. –1995. – Vol.34, № 9. – P. 1123–32.

17. Molinaro P. Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger 3 (NCX3) gene leads to a worsening of ischemic brain damage. / Molinaro P., Cuomo O., Pignataro G. [et al.] // The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience. – 2008. – Vol.28(5). – P.1179–84.

18. Oguro K. Histochemical study of Ca²⁺-ATPase activity in ischemic CA1 pyramidal neurons in the gerbil hippocampus. / Oguro K., Nakamura M., MasuzawaT.//Acta Neuropathologica. –1995. – Vol.90. – P. 448–53.

19. Pignataro G. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. / Pignataro G., Simon R., Xiong Z. // Brain. –2007. – Vol.130. – P.151–58.

20. Pulsinelli W. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia./Pulsinelli W., Brierley J., Plum F.// Ann. Neurol. –1982. – Vol. 11, № 5. – P. 491–498.

21. Revuelta-López E. Hypoxia-driven sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) downregulation depends on low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-signalling in cardiomyocytes./ Revuelta-López E., Cal R., Herraiz-Martínez A. [et al.] //Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2015. – Vol.85. – P. 25–36.

22. Schwab B. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis./ Schwab B., Guerini D., Didszun C. [et al.]//Cell Death and Differentiation. – 2002. – Vol.9. – P.818–831.

23. Syntichaki P. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?/ Syntichaki P., Tavernarakis N. //Nature Reviews Neuroscience. – 2003. – Vol.4, №8. – P.672–684.

24. Szatkowski M. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: Two phases of glutamate release by different mechanisms./ Szatkowski M., Atwell D.//Trends in Neurosciences. –1994. – Vol. 17,№9. – P. 359-365.

25. Toescu E. Region-specific activity of the plasma membrane Ca²⁺ pump and delayed activation of Ca²⁺ entry characterize the polarized, agonist-evoked Ca²⁺ signals in exocrine cells. / Toescu E., Petersen O. // Journal of Biological Chemistry. –1995. – Vol. 270, №15. – P. 8528–8535.

26. Usachev Y. Differentiation induces up-regulation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase and concomitant increase in Ca²⁺ efflux in human neuroblastoma cell line IMR-32. /UsachevY., Toutenhoofd S., Goellner G. [et al.]//Journal of Neurochemistry. –2001. – Vol.76. – P. 1756–1765.

27. ValsecchiV.. NCX1 is a novel target gene for hypoxia-inducible factor-1 in ischemic brain preconditioning. Stroke/ Valsecchi V., Pignataro G., Del Prete A. [et al.]// Journal of Cerebral Circulation. –2011. – Vol.42, №3. – P. 754–763.

28. Woodruff T. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. / Woodruff T., Thundyil J., TangS. [et al.] //Molecular Neurodegeneration. – 2011. – Vol. 6, №1. – P.6-11.

Надійшла до редколегії 14.12.15

A. Майстренко, млад. науч. сотр., Н. Войтенко, д-р биол. наук
Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ Кальциевой СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ – НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

В этом обзоре описываются особенности работы систем, обеспечивающих восстановление гомеостаза кальция во время ишемического повреждения нейронов гиппокампа. Высокий уровень внутриклеточного Ca²⁺, эксайтотоксическая активность глутамата и формирование свободных радикалов во время ишемии являются одним из основных повреждающих факторов, ведущих к дальнейшему повреждению нейронов гиппокампа. Понимание механизмов способных предупредить развитие поврежденных сегодня является ключевым для разработки стратегий нейропротективного пост- и прекодиционирования.

Ключевые слова: SERCA – Ca²⁺-АТФаза эндоплазматического ретикулума, PMCA – Ca²⁺ АТФ-аза плазматической мембраны, ишемическое поражение, гиппокамп.

A. Maistrenko, junior researcher, N. Voitenko, DSc.
Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, Ukraine

FEATURES OF CALCIUM SIGNALING IN ISHEMIC INJURY NERVOUS TISSUE – OF NEURONS IN THE HIPPOCAMPUS

This review describes the features of the systems to ensure the restoration of calcium homeostasis of hippocampal neurons during ischemic injury. High levels of intracellular Ca²⁺, glutamate excitotoxicity activity and the formation of free radicals during ischemia are a major damaging factors, leading to further damage to hippocampal neurons. Understanding the mechanisms able to prevent the development of damage today is key for the development of post- and preconditioning neuroprotective strategies.

Keywords: SERCA – Ca²⁺-ATPase of endoplasmic reticulum, PMCA – Ca²⁺ATP-ASE of plasmatic membrane, ischemic injury, the hippocampus.

УДК:602:575.853

Г. Світліна, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
В. Шаблій, канд. біол. наук
Інститут клітинної терапії, Київ

МЕТОДИ ОТРИМАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ У ЩУРІВ

Плацента є цінним джерелом мультипотентних стовбурових клітин (ПМСК), які широко починають використовуватися у клітинній терапії. Таким чином, пошук найбільш оптимального методу отримання таких клітин є відкритим. Метод посадки експлантів та ферментативної обробки дозволяють отримати ПМСК плодового походження, які зберігають здатність диференціюватися у мезенхімальних напрямках до 4 пасажу. Аллогена щуряча сироватка не підтримує становлення та ріст ПМСК, тому залишається широким використанням фетальної бичачої сироватки, ксеногенної по відношенню до клітин.

Ключові слова: плацента, стовбурові клітини, клітинна терапія.

Вступ. На сьогодні клітинна терапія та регенеративна медицина все більше впроваджується в клінічне застосування та набуває розповсюдження, як іннова-

ційні персоналізовані біотехнологічні методи лікування [1-4]. Мезенхімальні стовбурові клітини займають (МСК) основне місце серед типів клітин, що проходять клінічні

© Світліна Г., Гарманчук Л., Шаблій В., 2015

випробування та вже застосовуються в медичній практиці. Потенційним джерелом стовбурових клітин можуть слугувати різні типи тканин людини (кістковий мозок, жирова тканина, ендометрій тощо), але використання плаценти як джерела МСК має низку переваг [5-7]. Використання зрілої плаценти не має етичних проблем, не потребує інвазивних втручань, клітини виділені з нею мають ряд переваг, порівняно із МСК кісткового мозку та жирової тканини через те що плацента відіграє фундаментальну роль у підтриманні толерантності материнського організму до розвитку плода [8-11]. Потрібно відмітити, що плацента може слугувати джерелом не тільки мезенхімальних стовбурових клітин, але також епітеліальних та ендотеліальних. На разі, лікування із застосуванням трансплантації плацентарних МСК проходить перші фази клінічних випробувань [12].

Для вивчення процесів формування і функціонування плаценти у людини використовують модель плацентациї у щурів. У обох видів встановлено подібність процесів і залучених механізмів у процесах інвазії, ремодельованні спіральних артерій, імунологічних змін тощо [13-15].

На сьогодні відомо декілька методів виділення мультипотентних стовбурових клітин з плаценти щурів (ПМСК) 21-го дня гестації [16], але не оцінювався найбільш оптимальний склад поживного середовища, тип покриття, на якому найкраще підтримується ріст та зберігаються мультипотентні властивості клітин. Таким чином, головною метою було підібрати найбільш оптимальні умови виділення і культивування ПМСК.

Матеріали та методи. *Методи отримання ПМСК зі зрілої плаценти щурів.* Самок щурів (n=3) на 21-му дні вагітності поміщали у камеру з CO₂ на 2 хв, декапітували та вирізували плаценти фетусів чоловічої статі з дотриманням правил асептики та антисептики. Плаценти промивали в розчині Хенксу з додаванням 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпеницилліну. Амніотичні та децидуальні оболонки видаляли і в подальшому працювали з ворсинчастою тканиною лабіринто- і спонгіотрофобласта. Тестовані методи посадки ПМСК: 1. Метод експлантів. Тканину подрібнювали стерильними ножицями у повному середовищі на фрагменти розміром 1-2 мм³; 2. Ферментативний. Тканину інкубували в розчині 0,1% колагенази та 0,6 од/мл диспази I при 37 °C протягом 30 хв. Отриману суспензію клітин відмивали від ферментів шляхом центрифугування при 300 g 10 хв та перерозчиняли у поживному середовищі. Клітини висівали на адгезивний пластик із розрахунку 200 тис на см². Для визначення найбільш оптимального складу поживного середовища були використані наступні: 1. Альфа-МЕМ, 10% фетальної бичачої сироватки (ФБС), 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпеницилліну; 2. ДМЕМ, 10% ФБС, 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпеницилліну; 3. Альфа-МЕМ, 10% алогогенної щурячої сироватки (АЩС), 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпеницилліну; 4. ДМЕМ, 10% АЩС, 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпеницилліну. Фрагменти тканини отримані методом експлантів висаджували на адгезивний пластик для культур клітин та на пластик, покритий колагеном.

При посадці методом експлантів першу зміну середовища проводили на 7-ий день культивування, після ферментативного способу виділення – на 2-ий день, пода-

льші зміни здійснювали двічі на тиждень. Після досягнення культурою 80-90% моношару, клітини пересівали. Для цього культуру промивали у фосфатному сольовому буфері від залишків сироватки, інкубували у розчині 0,05% трипсину, після цього відмивали від залишків трипсину шляхом центрифугування та висівали 5 тис на см².

Отримання АЩС. Здорових щурів 1-1,5 року поміщали у камеру з CO₂ на 2 хв, декапітували та набирали кров з стегнової вени. Цільну кров витримували 30 хв при кімнатній температурі, після чого центрифугували протягом 20 хв при 1000 g та відбирали супернатант. Отриману сироватку інактивували впродовж 30 хв при 56 °C.

Остеогенне та адипогенне диференціювання. Для визначення здатності клітин диференціюватися в остеогенному напрямку культуру клітин на 4-му пасажі культивували в середовищі ДМЕМ з 10⁻⁷ М дексаметазону, 10 мМ β-гліцерофосфату і 0,1 мМ аскорбат-2-фосфату протягом 21 доби. Мінералізований матрикс виявляли фарбуванням 1 % розчином алізаринового червоного. Для адипогенного диференціювання клітини культивували в ДМЕМ з додаванням 10% ФБС, 1 мкМ дексаметазону, 0,5 мМ ізобутил-метилксантину, 0,06 мМ індометацину і 5 мкг/мл інсуліну протягом 21 доби. Жирові включення виявляли фарбуванням жиророзчинним О. Як контроль були використані клітини, культивовані протягом того ж терміну в живильному середовищі без факторів диференціювання.

Флуоресцентна in situ гібридизація (FISH). Для проведення FISH аналізу брали ПМСК 4-го пасажу, отримані методом посадки експлантів (n=3) та ферментативним методом (n=3) з плаценти фетусів чоловічої статі. Приготування препаратів для гібридизації проводили за стандартною методикою. Для гібридизації використовували зонди Chromosome Y-green and Chromosome X-orange X-Cyting Rat Chromosome Painting. Ядра фарбували розчином DAPI (Abbot Molecular, USA). Для аналізу підраховували не менше 300 ядер. Візуалізацію проводили на флуоресцентному інвертованому мікроскопі Axio Imager M1.

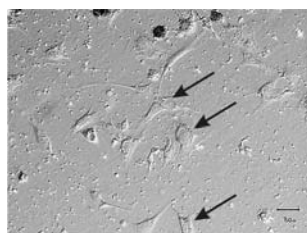
Результати та їх обговорення.

Після посадки експлантів плаценти, тканина прикріплювалася впродовж першого тижня, а після сьомого дня культивування можна було спостерігати вихід клітин та утворення колоній навколо прикріплених фрагментів. Ми очікували, що використання колагенового покриття буде сприяти швидшому прикріпленню та росту культури, але за нашими даними ріст культури на пластику відбувався швидше, ніж на колагеновому покритті. Цікавим є факт, що використання алогогенної щурячої сироватки пригнічувало вихід, прикріплення та ріст клітин з посадженого експланту, тому вже після першого пересіву (на 1-му пасажі) клітини не ділилися та не прикріплювалися при слідуєчому пересіві. Ми вважаємо, що АЩС стимулює вихід та ріст клітин відмінних від мезенхімальних стовбурових клітин, бо у клітин відсутня веретенноподібна форма, клітини містять багато включень у цитоплазмі. При використанні ферментативного способу виділення ПМСК, моношар клітин утворювався порівняно швидко. Схожа ситуація спостерігається щодо впливу АЩС, клітини затримувалися в рості і не переживали двох пересівів. Використання середовища альфа-МЕМ як базового є переважним, бо клітини в подальшому пересівалися більшу кількість разів.

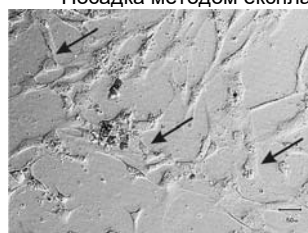
Таблиця 1. Характеристики культур ПМСК, виділених різними методами

метод виділення культур	склад середовища	поверхня, на яку висаджували клітини	день досягнення 80-90% моношару на 0-му пасажі	пасаж, на якому відбувалося старіння культури
посадка експлантів	1 (альфа-МЕМ, ФБС)	колаген	15-17	3-4
	1 (альфа-МЕМ, ФБС)	пластик	7-17	4-7
	3 (альфа-МЕМ, АЩС)	колаген	15-23	1-4
	3 (альфа-МЕМ, АЩС)	пластик	17-21	1-3
ферментативний	1 (альфа-МЕМ, ФБС)	пластик	5-6	5
	2 (ДМЕМ, ФБС)	пластик	6	3
	3 (альфа-МЕМ, АЩС)	пластик	14-30	1 або не вдалося отримати культуру
	4 (ДМЕМ, АЩС)	пластик	10	1

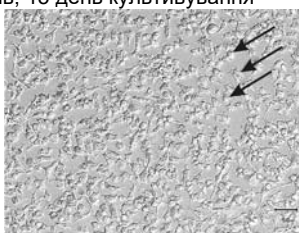
Посадка методом експлантів, 15 день культивування



альфа-МЕМ, ФБС, колаген



альфа-МЕМ, ФБС, пластик

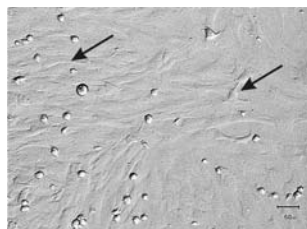


альфа-МЕМ, АЩС, колаген

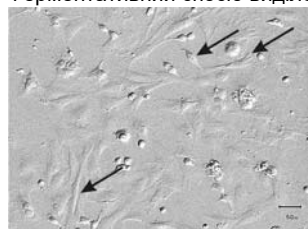


альфа-МЕМ, АЩС, пластик

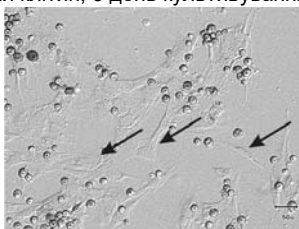
Ферментативний спосіб виділення клітин, 6 день культивування



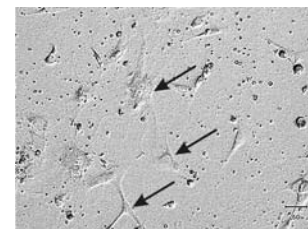
альфа-МЕМ, ФБС, пластик



ДМЕМ, ФБС, пластик



альфа-МЕМ, АЩС, пластик



ДМЕМ, АЩС, пластик

Рис.1. Репрезентативні фотографії культур ПМСК при використанні різних методів виділення на 0-му пасажі; стрілками показано клітини типової морфології; довжина шкали = 50 мкм.

При старінні ПМСК кількість клітин посаджених клітин дорівнювала кількості знятих клітин, після чого клітини вже не прикріплювалися до культуральної поверх-

ні. При цьому спостерігалось збільшення клітин у розмірах, збільшення частки синтетично активних клітин з 3-7 ядерцями та включеннями у цитоплазмі (рис.2).

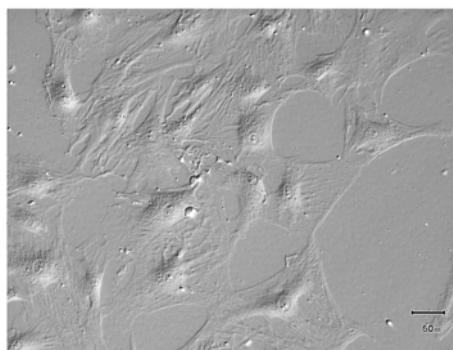


Рис.2. Репрезентативна морфологія старіючої ПМСК; фазово-контрасна мікроскопія; довжина шкали = 50 мкм.

Таким чином, найбільш оптимальним за складом середовищем для росту ПМСК був альфа-МЕМ з додаванням 10% ФБС, 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпенициллину. Використання додаткового покриття колагеном, для пришвидшення прикріплення експлантів тканини не було доцільним. Для підтвердження мультипотентності

ПМСК, отриманих ферментативним методом чи методом експлантів було поставлене направлене диференціювання у адипогенному і остеогенному напрямках. В результаті, ПМСК, виділені обома методами зберігали здатність сильно диференціюватися у мезенхімальних напрямках на 4 пасажі (рис.3).

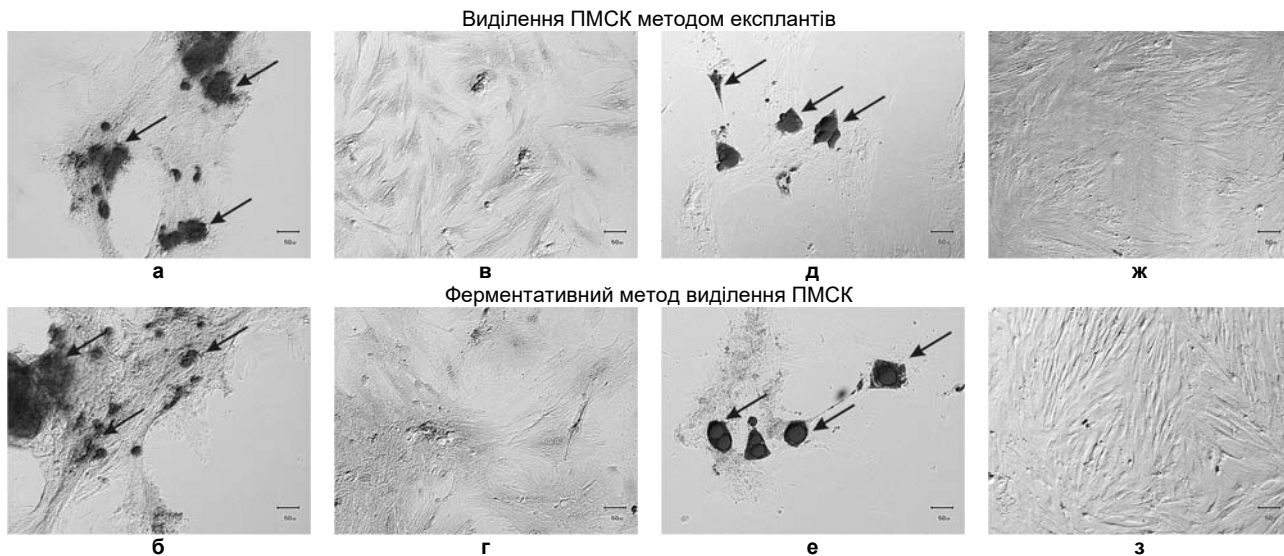


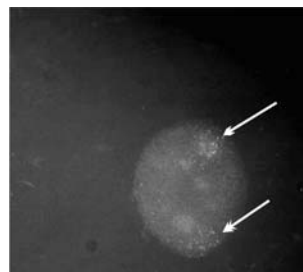
Рис.3. Направлене диференціювання ПМСК у мезенхімальних напрямках: а, б – остеогенне диференціювання, накопичені кальцієві депозити забарвлені червоним (вказані стрілками), забарвлення алізариним червоним; в, г – контроль до остеогенного диференціювання, не спостерігається відкладання кальцію клітинами, забарвлення алізариним червоним; д, е – адипогенне диференціювання, спостерігається вміст жирових вакуоль у клітинах (вказано стрілками), забарвлення жиривим червоним О; ж, з – контроль до остеогенного диференціювання, відсутні жирові включення, забарвлення жиривим червоним О; довжина шкали = 50 мкм.

Відомо, що плацента містить частину клітин плодового, а частину материнського походження. Виділення клітин плодового походження є більш необхідним для використання у клітинній терапії, по-перше, можливе подальше збереження (кріоконсервування) для аутологічного застосування, клітини характеризуються біль-

шими потенціями до диференціювання та приживлення в організмі реципієнта. За результатами FISH аналізу, культури ПМСК, отримані і методом експлантів і ферментативним методом, вирощені на середовищі складом 1, мали фетальний чоловічий каріотип (рис.4)



ПМСК, виділені методом експлантів



ПМСК, виділені ферментативним методом

Рис. 4. FISH аналіз ПМСК, флуоресцентна мікроскопія; одинарною стрілкою показано сигнал Y хромосоми, подвійною стрілкою показано сигнал X хромосоми; $\times 1000$

Висновки. Плацента є важливим джерелом стовбурих клітин плодового походження, які можна виділити і методом експлантів і ферментативним методом. Зважаючи на вищезазначений факт, виділення ПМСК методом експлантів є менш трудомістким та менш затратним. Найкраще підтримує ріст та мультипотентні властивості середовище альфа-МЕМ з 10% ФБС. Використання аллогенної сироватки не підтримує ріст ПМСК.

Список використаних джерел

1. Titomanlio L. Stem cell therapy for neonatal brain injury: perspectives and challenges. / Titomanlio L, Kavelaars A, Dalous J, Mani S, El Ghouzzi V, Heijnen C, Baud O, Gressens P. //Annual Neurology. 2011;70:698–712.
2. Li Z. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cell-induced neural stem cells to treat spinal cord injury./ Li Z, Zhao W, Liu W, Zhou Y, Jia J, Yang L.// Neurology Regen Research. 2014;9(24):2197-204. doi: 10.4103/1673-5374.147953.
3. Ventura C. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts./ Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, et al. // Journal Biology Chemistry.2007;282:14243–14252.

4. Chamberlain G. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. / Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton// Journal Stem Cells. 2007;25:2739–2749.
5. Wulf GG. Mesengenic progenitor cells derived from human placenta./ Wulf GG, Viereck V, Hemmerlein B, Haase D, Vehmeyer K, Pukrop T, Glass B, Emons G, Trümper L.// Tissue Engineering. 2004;10:1136–1147.
6. Wolbank S. Alternative sources of adult stem cells: human amniotic membrane. Wolbank S, van Griensven M, Grillari-Voglauer R, Peterbauer-Scherb A.// Advances Biochemistry Engineering Biotechnology. 2010;123:1–27.
7. Rus Ciucă D. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. /Rus Ciucă D, Sorîţău O, Suşman S, Pop VI, Mişu CM.// Romanian Journal Morphology and Embryology. 2011;52:803–808.
8. Karlsson H. Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic settings in vitro. / Karlsson H, Erkers T, Nava S, Ruhm S, Westgren M, Ringdén O. // Clinical Experimental Immunology. 2012;167:543–555.
9. Miao Z. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells./ Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X. // Cell Biology International. 2006;30:681–687.
10. Apps R. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies./ Apps R,

Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, Moffett A// Immunology. 2009;127:26–39.

11. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. / Erlebacher A. // Annual Review Immunology. 2013;31:387-411. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003.

12. Parolini O. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update. / Parolini O, Caruso M. // Placenta. 2011;32 Suppl 2:S186–S195.

13. Soares MJ. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface./ Soares MJ, Chakraborty D, Karim Rumi MA, Konno T, Renaud SJ// Placenta. 2012;33(4):233-43. doi: 10.1016/j.placenta.2011.11.026

14. Konno T. Pregnancy in the brown Norway rat: a model for investigating the genetics of placentation. / Konno T, Rempel LA, Arroyo JA, Soares MJ. // Biology Reproduction. 2007;76(4):709-18.

15. Carter AM. Animal models of human placentation--a review./ Carter AM. // Placenta. 2007;28 Suppl A:S41-7.

16. Ding HF. Therapeutic effect of placenta-derived mesenchymal stem cells on hypoxic-ischemic brain damage in rats./ Ding HF, Zhang H, Ding HF, Li D, Yi XH, Gao XY, Mou WW, Ju XL. // World Journal Pediatric. 2015;11(1):74-82. doi: 10.1007/s12519-014-0531-8.

Надійшла до редколегії 22.12.15

Г. Свитина, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
В. Шаблій, канд. біол. наук
Институт клеточной терапии, Киев, Украина

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ У КРЫС

Плацента является ценным источником мультипотентных стволовых клеток (ПМСК), которые широко используются в клеточной терапии. Таким образом, поиск наиболее оптимального метода получения таких клеток остается открытым. Метод посадки эксплантов и ферментативной обработки позволяют получить ПМСК плодового происхождения, которые сохраняют способность дифференцироваться в мезенхимальных направлениях до 4 пассажа. Аллогенная крысиная сыворотка не поддерживает становление и рост ПМСК, поэтому использование фетальной телячьей сыворотки, ксеногенной по отношению к клеткам, остается широким.

Ключевые слова: плацента, стволовые клетки, клеточная терапия.

G. Svitina, PhD stud., L. Garmanchuk, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
V. Shablyi, PhD
Institute of cell therapy, Kyiv, Ukraine

METHODS OF OBTAINING MULTIPOTENT STEM CELLS OF THE PLACENTA IN RATS

Placenta is a valuable source of multipotent stem cells (PMSC) widely used for cell therapy. Hence, the most optimal method of PMSC obtaining remains questionable. By methods of explant culturing and enzymatic digestion were obtained PMSC of fetal origin and multipotent features at 4th passage. Allogeneic rat serum is not favor PMSC establishment and growth, consequently the use is made of fetal bovine serum, that is xenogeneic for cell cultures.

Key words: Placenta, stem cells, cell therapy.

УДК 582.28.614.876

А. Тугай, пошукач, Т. Тугай, д-р біол. наук
Институт мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ,
Д. Лукашов, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО ОПРОМІНЕННЯ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТРЬОХ ОПРОМІНЕНИХ "ПОКОЛІНЬ" ASPERGILLUS VERSICOLOR

Охарактеризовано вплив хронічного опромінення на три "покоління" *Aspergillus versicolor*, які були отримані в модельних умовах з двох батьківських штамів: *A.versicolor* 99 з радіоадаптивними властивостями, що був ізольований з приміщень об'єкту "Укриття" Чорнобильської АЕС, та *A.versicolor* 432 – контрольного. При культивуванні на двох середовищах з різним вмістом джерела вуглецю у досліджених "поколінь" *A. versicolor* 99 та *A. versicolor* 432 виявлено різноспрямовані зміни швидкості радіального росту (від сповільнення до пришвидшення), які за величиною знаходились у межах від 60% до 140% (на сушло-агарі) та від 70% до 230% (на золотному агарі) по відношенню до відповідних неопромінених "поколінь". Виявлені зміни у профілі активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази, каталази, пероксидази, що мають хвелеподібний характер у трьох досліджених "поколінь" *A.versicolor* 432 і *A.versicolor* 99 (за виключенням каталази) та високу амплітуду коливань від зменшення (до 70%) до збільшення (до 900%).

Ключові слова: іонізуюче опромінення, "покоління" *Aspergillus versicolor*, ферменти антиоксидантного захисту.

Вступ. За майже 30 років, які минули після аварії на Чорнобильській АЕС, було встановлено низку радіобіологічних явищ, котрі у своїй сукупності визначають формування віддалених наслідків опромінення на різних рівнях організації біотичних систем [1-4]. Радіонукліди в екосистемі перебувають у постійній міграції, внаслідок чого всі представники біоти, включаючи мікроорганізми, гриби, рослини і тварини, а також людина зазнають додаткового опромінення. Особливий науковий інтерес має дослідження наслідків впливу хронічного опромінення в популяціях мікроміцетів, виділених з приміщень об'єкту "Укриття" ЧАЕС з різним рівнем радіоактивного забруднення, у яких сформувались нові, раніше невідомі радіоадаптивні властивості (позитивний радіотропізм, радіостимуляція, адаптивна відповідь) за дії великих доз опромінення [5, 6, 7]. Найбільш поширеним видом мікроміцетів у приміщеннях об'єкту "Укриття" є *Aspergillus versicolor*, у штамів якого було виявлено ра-

діоадаптивні властивості. *A.versicolor* є звичайним еврибіонтним видом у наземних та водних екосистемах, часто трапляється у вологих закритих приміщеннях, може викликати руйнування конструкційних матеріалів та призводити до захворювань людини [8]. Розуміння механізмів адаптації *A. versicolor* до критичних умов середовища є важливим для оцінки та прогнозу його шкодочинності. Особливої уваги заслуговує дослідження характеру змін фізіолого-біохімічних властивостей у "поколіннях" опромінених мікроміцетів, ступеню їх прояву та стабільності, що дасть інформацію для прогнозів щодо віддалених наслідків дії хронічного опромінення на мікобіоту.

Метою роботи було вивчення біологічної активності у ряду опромінених в модельних умовах генерацій *A.versicolor* на рівні організму – за швидкістю радіального росту та на молекулярному – за активністю ключових ферментів антиоксидантного захисту (каталази, пероксидази, супероксиддисмутази).