

UDC 616.314-089.818.1-76**CLINICAL ASPECTS of ОДОНТОПРЕПАРУВАННЯ of HARD TISSUES of TEETH UNDER CERAMET CONSTRUCTIONS****Ramus M. A.**

Summary. In the article manipulation recommendations are presented in the leadthrough of preparovka of hard tissues of tooth at making of ceramet construction being based on scientifically practical approach. The special attention is spared to the sequence of leadthrough of this manipulation taking into account the areas of safety of different groups of teeth, and also to the features of planning and forming of neck ledge. The all higher expounded will allow to the practicing stomatologies-orthopaedists to optimize the method of odontopreparing during work with a ceramet.

Key words: preparation of hard tissues of tooth, ceramet, retraction of gum, neck ledge of tooth, parodontologic aspects.

Стаття надійшла 27.10.2010 р.

УДК 612.451.014:577.336**В. Д. Устиченко, Н. М. Алабедалькарим, Т. П. Бондаренко**

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ ПРИ ПОМОЩИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской темы «Свойства эндокринных тканей в условиях криоконсервирования и трансплантации экспериментальным животным» (№ государственной регистрации 0106U002163).

Вступление. Для интегральной оценки качества биологического материала необходимо использование достаточного количества методов, применение которых в совокупности позволяет отразить уровень его функциональной активности. Однако при экспериментальных исследованиях, направленных на разработку методов получения клеток, изучение их функциональной активности после культивирования, криоконсервирования, длительного хранения и т.д., необходимо наличие экспресс-методов оценки жизнеспособности. Одним из наиболее широко используемых методов для экспресс-оценки жизнеспособности клеток является окрашивание суправитальным красителем трипановым синим, к преимуществам которого относится простота использования, возможность определения жизнеспособности в данный момент времени. Однако данный метод имеет некоторые погрешности, которые в конечном итоге сказываются на определении реального количества жизнеспособных клеток. [4]. Однако, даже в случае строгого соблюдения протокола окрашивания трипановым синим наблюдается завышение показателя жизнеспособности клеток [0, 2], поскольку данный метод отражает целостность

клеточной мембраны, как ядросодержащих, так и безъядерных клеток, в том числе везикул [5]. Для решения этой проблемы в нашей работе мы оценивали жизнеспособность клеток с использованием двойного окрашивания флуоресцеин диацетатом (ФДА) и пропидиум йодидом (ПИ). ФДА – гидрофобное нефлуоресцирующее соединение, легко проникающее через клеточную мембрану внутрь клеток, где метаболизируется до флуоресцеина, обладающего зеленой флуоресценцией, свидетельствующей о жизнеспособности клеток. ПИ обладает способностью специфически окрашивать нуклеиновые кислоты и используется для визуализации погибших клеток, поскольку проникает в них через поврежденную цитоплазматическую мембрану, связывается с ДНК клеточного ядра и обеспечивает флуоресценцию в красной области спектра [4]. Нами была предпринята попытка модифицировать метод таким образом, чтобы в случае двойного окрашивания ФДА/ПИ окрашивание ПИ проводить в присутствии фиксатора глутарового альдегида. При этом мы руководствовались тем, что использование последнего облегчает доступ ПИ и обеспечивает его связывание с ДНК в клетках, сохранивших ядра [3]. В этом случае накопление ФДА будет являться показателем функциональной активности внутриклеточных эстераз, а окрашивание ПИ будет свидетельствовать о наличии клеточного ядра. Формирующаяся при этом красно-оранжевая

или оранжевая флуоресценция может визуализироваться при помощи флуоресцентного микроскопа, а также FACS-анализа.

Целью данного исследования было провести сравнительный анализ эффективности методов оценки жизнеспособности клеток надпочечников новорожденных поросят путем окрашивания трипановым синим и флуоресцентными красителями ФДА/ПИ.

Объект и методы исследования. Новорожденных поросят забивали с применением эфирного наркоза. Надпочечные железы немедленно извлекали в стерильных условиях, тщательно отмывали средой 199, содержащей 100 ед/мл пенициллина и 200 мкг/мл стрептомицина, измельчали на фрагменты, размером 1-3 мм³, и помещали в охлажденную среду 199.

Суспензию клеток получали из фрагментов надпочечников ферментативным методом путем 3-х кратного инкубирования в среде 199, содержащей коллагеназу (2 мг/мл) и ДНазу (0,2 мг/мл) при 37°C в течение 30 мин. Суспензии клеток надпочечников, полученные на всех этапах коллагенизации, объединяли и отмывали 2 раза средой 199 с 10% КРС (200г, 3 мин), фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 мкм, после чего снова подвергали центрифугированию при тех же условиях.

Процент жизнеспособных клеток определяли при помощи суправитального окрашивания с использованием 0,2% водного раствора трипанового синего. Для определения жизнеспособности при помощи флуоресцентных красителей суспензию клеток надпочечников инкубировали в течение 10 мин при 37°C с 1 мкг/мл ФДА. Затем добавляли ПИ, конечная концентрация которого составляла 2 мкг/мл, и инкубировали при + 4°C в течение 10 мин, фиксировали в 0,75% растворе глютарового альдегида в течение 30 мин в тех же условиях. В последующем образцы дважды отмывали средой 199 и просматривали на люминесцентном микроскопе Olympus IX-71 при длине волны возбуждения флуоресценции 488 нм, а также на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD). Статистическую обработку данных проводили методом ANOVA с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты исследований и их обсуждение. На рис. 1 (а, б) представлены микрофотографии клеток надпочечников новорожденных поросят, окрашенных ФДА/ПИ по вышеуказанному методу.

Включение ФДА (зеленая флуоресценция) и ПИ (оранжевая флуоресценция) свидетельствует о жизнеспособности ядросодержащих клеток (1). Наличие только оранжевой флуоресценции (2) является признаком отсутствия активности внутриклеточных эстераз ядросодержащей клетки, то есть является доказательством ее нежизнеспособности. Подсчет флуоресцирующих объектов (рис. 1а) и общего количества клеток (рис. 1б) позволяет выявить наличие безъядерных клеток.

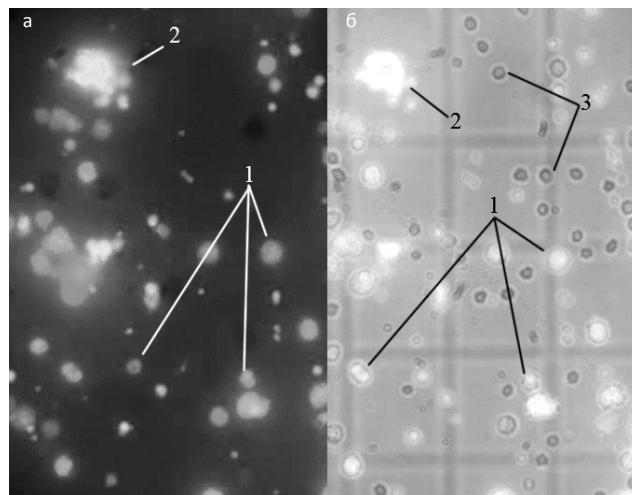


Рис. 1. Суспензия нативных клеток надпочечников новорожденных поросят, окрашенных ФДА/ПИ: 1 – ФДА+/ПИ+ – жизнеспособные ядросодержащие клетки; 2 – ФДА-/ПИ+ – нежизнеспособные ядросодержащие клетки; 3 – ФДА-/ПИ- – безъядерные клетки; (А) – при возбуждении ($\lambda=488$ нм), (Б) – при возбуждении ($\lambda=488$ нм) и в проходящем свете одновременно. Увеличение x 400.

Анализ клеточной суспензии методом проточной цитофлуориметрии показал, что при окрашивании ФДА и ПИ по стандартному протоколу (без использования глютарового альдегида), были выделены следующие группы клеток: нежизнеспособные клетки, включившие ПИ (15%), клетки с активно функционирующими внутриклеточными эстеразами, то есть включившие ФДА (60%), и группа клеток без флуоресценции (рис. 2а).

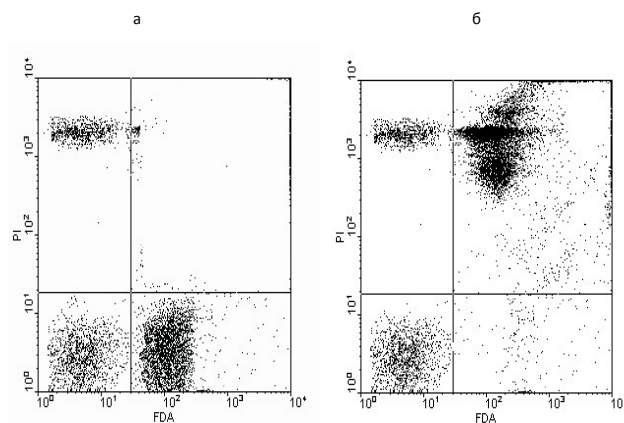


Рис. 2. Цитограммы распределения клеток надпочечников новорожденных поросят, окрашенных ФДА/ПИ стандартным методом (а) и модифицированным методом (б).

Поскольку последняя группа клеток не включает ПИ, по формальным признакам эти клетки могут считаться жизнеспособными. При окрашивании ФДА/ПИ в нашей модификации становится очевидным, что клетки основной популяции, включившие ФДА, окрашиваются также и ПИ,

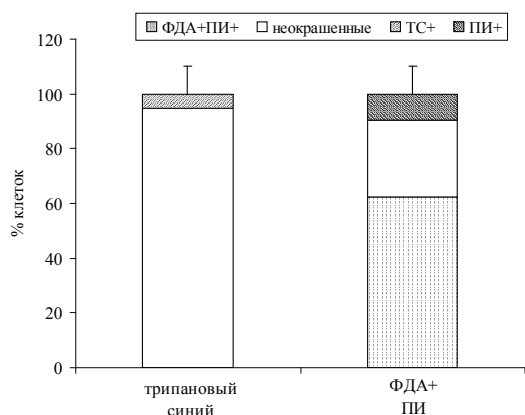


Рис. 3. Жизнеспособность клеток надпочечников новорожденных поросят по исключению трипанового синего (ТС) и включению ФДА/ПИ.

что свидетельствует о сохранении в них ядер (рис. 2б). Сохраняется процентное соотношение ФДА-/ПИ+ клеток, что отражает их жизнеспособность при использовании обоих методов окрашивания. Клетки, не имеющие характерной зеленой флуоресценции ФДА, в обоих случаях не включают ПИ в связи с отсутствием в них ядер. Таким образом, клетки, которые были формально отнесены к числу жизнеспособных, благодаря сохранению целостности цитоплазматической мембраны, стало возможным идентифицировать как нежизнеспособные в связи с отсутствием ядер.

На рис. 3 представлены данные, позволяющие сравнить уровень жизнеспособности нативной суспензии клеток надпочечников, оцененной двумя различными методами: по исключению трипанового синего и окрашиванию ФДА/ПИ в нашей модификации.

Окрашивание трипановым синим показало наличие в нативной суспензии $94,8 \pm 2,05\%$ жизнеспособных клеток. Количество жизнеспособных

клеток, определяемых по окрашиванию ФДА и ПИ (ФДА+/ПИ+) было ниже на $32,42 \pm 1,98\%$.

Подсчет флуоресцирующих объектов и общего количества клеток показал, что $28 \pm 2,03\%$ клеток не включили ни ФДА, ни ПИ (ФДА-/ПИ-), то есть являются нежизнеспособными и безъядерными. Количество ФДА-/ПИ+ клеток, то есть нежизнеспособных ядродержащих, достоверно не отличалось от количества клеток, включивших трипановый синий, и составляло $5,2 \pm 0,25\%$ и $9,6 \pm 0,95\%$ соответственно.

Выводы. Совместное окрашивание ФДА/ПИ в нашей модификации позволяет оценить реальную жизнеспособность клеток, исключив из этого числа безъядерные клетки и везикулы, способные к исключению трипанового синего.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшие исследования предполагают применение данного метода оценки жизнеспособности клеток при разработке методов получения культуры клеток надпочечников, а также при ее последующем криоконсервировании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abduvaliev A. A. Differential trypan blue staining of tumor cells for the determination of apoptosis / A. A. Abduvaliev, M. S. Gil'dieva // *Klin. Lab. Diagn.* — 2006. — № 2. — P. 36-38.
2. Altman S.A. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations / S.A. Altman, L. Randers, G. Rao // *Biotechnol. Prog.* — 1993. — V. 9. — № 6. — P. 671-674.
3. Y. Morono [et. al] // *Biotechnology Letters.* — 2004. — V. 26. — № 5. — P. 379-383.
4. Jones K. H. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide / K. Jones, J. A. Senft // *J. Histochem. Cytochem.* — 1985. — V. 33. — № 1. — P. 77-79.
5. Sharpe R. L. Lactate efflux from sarcolemmal vesicles isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* white muscle is via simple diffusion / R. L. Sharpe, C. L. Milligan // *J. Exp. Biol.* — 2003. — V. 206 (Pt 3). — P. 543-549.

УДК 612.451.014:577.336

ОЦІНКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ БАРВНИКІВ

Устиченко В.Д., Алабедацькари́м Н.М., Бондаренко Т.П.

Резюме. Досліджено життєздатність клітин надниркових залоз новонароджених поросят за допомогою забарвлення трипановим синім, ФДА/ПІ. Показано, що подвійне забарвлення ФДА і ПІ дозволяє адекватно оцінити життєздатність клітин.

Ключові слова: надниркові залози, життєздатність, трипановий синій, ФДА, ПІ.

УДК 612.451.014:577.336

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ ПРИ ПОМОЩИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Устиченко В.Д., Алабедацькари́м Н.М., Бондаренко Т.П.

Резюме. Исследована жизнеспособность клеток надпочечных желез при помощи окрашивания трипановым синим, ФДА/ПИ. Показано, что двойное окрашивание ФДА и ПИ позволяет адекватно оценить жизнеспособность клеток.

Ключевые слова: надпочечные железы, жизнеспособность, трипановый синий, ФДА, ПИ.

UDC 612.451.014:577.336

ESTIMATION of NEWBORN PIGLETS ADRENAL CELL VIABILITY USING FLUORESCENT DYES

Ustichenko V.D., Alabedalkarim N.M., Bondarenko T.P.

Summary. There was investigated the viability of newborn piglets adrenal cell using trypan blue and fluorescent dyes FDA/PI. It was shown the double staining by FDA and PI allows adequately to estimate of cell viability.

Key words: adrenal glands, viability, trypan blue, FDA, PI.

Стаття надійшла 28.10.2010 р.