

УДК 61:577.1

Васильева И.Г., Олексенко Н.А., Путь А.С., Макаренко А. Н.

ВЛИЯНИЕ АНТИИНСУЛЬТНОГО СРЕДСТВА ЦЕРЕБРАЛА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

1. ГУ "Институт нейрохирургии НАМНУ им. акад. А.П.Рамаданова"

2. Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

Проведены исследования влияния антиинсультного средства Церебрал на мезенхимальные стволовые клетки (МСК), полученные из тканей костного мозга человека. Установлено, что молекулы, входящие в состав средства Церебрал, достоверно влияют на процессы пролиферации и дифференциации клеточной линии МСК костного мозга. Обнаружено увеличение клеточных популяций и направленный клеточный рост стволовых клеток костного мозга. Под действием Церебрала содержание CD 105⁺ клеток увеличилось в 40 раз, при этом они составляли 87% клеточной популяции. Плотность сформированного монослоя была меньше, но при этом он был структурированным – отростки клеток имели направленный рост, формируя сетевую структуру.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК), костный мозг, церебрал.

Введение

В настоящее время костный мозг является общепризнанным источником получения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделение и количественное наращивание которых в условиях использования культуральных технологий является перспективным современным направлением регенеративной медицины. Кроме того, культура МСК может быть использована в качестве тестовой и экспресс систем для оценки влияния тех или иных веществ, известных и потенциальных лекарственных препаратов на процессы клеточной трансформации и регенерации в организме.

Объект и методы исследования

Эксперименты выполнялись на клеточном материале, полученном из тканей костного мозга взрослых пациентов (больных) во время выполнения плановой операции (по поводу травмы кисти) в Институте травматологии и ортопедии АМН Украины (01601, ул. Воровского, 27) города Киева. Донорами клеточного материала стали пациенты в возрасте 45 и 57 лет.

Выделение и культивирование МСК костного мозга: 20-25 мл аспирата костного мозга отбирали в стерильных условиях в контейнер путем пункции под местной анестезией (0,5% р-ра бупивакаина Украина). Затем аспират смешивали с 2 объемами раствора Хэнкса (РАА, Австрия) и центрифугировали при 900g на протяжении 10 мин (ОПН-8, Россия) [1,3,5].

Осадок разделяли в градиенте плотности (1,073 г/мл) перколла (Sigma, Германия), клеточная плотность – $1-2 \times 10^7$ кл/мл. После этого градиент центрифугировали 30 мин. Осажденные при 900g мононуклеарные клетки ресуспендировали в растворе Хэнкса и центрифугировали 10 мин при 460g [2,6,7].

Полученный клеточный осадок ресуспендировали в среде Игла в модификации Дульбекко с низким содержанием глюкозы (РАА, Австрия), обогащенной 10% фетальной телячьей сывороткой (РАА, Австрия) до концентрации 1×10^6 в чашке Петри диаметром 100мм.. Полученную

суспензию помещали в инкубатор при 37°C, с содержанием CO₂ – 5%.

Через 24 ч в отбирали надосады, а адгезированную фракцию клеток оставляли для дальнейшего культивирования. В опытные образцы добавляли 0,2% раствор Церебрала. Культивирование проводили на протяжении 14 суток с периодической заменой питательной среды каждые 3-4 суток.

Иммуногистохимическое выявление CD 105⁺ клеток: По окончании культивирования культуральные образцы фиксировали в 4% растворе параформальдегида (Sigma, Германия) при 4 °C. Использовались первичные мышинные антитела к CD 105⁺ человека (Dako, Дания) в разведении 1:20. Визуализацию связывания проводили с помощью реактивов системы HRP/DAB Detection System (Dako, Дания).

Подсчет количества CD 105⁺ клеток проводился на каждом образце в 10 полях зрения в световом микроскопе СМ – 15 (ЛОМО, Россия).

Оценка жизнеспособности клеточной популяции: перед посадкой оценка жизнеспособности клеточной популяции проводилась путем подсчета содержания мертвых клеток в клеточной суспензии после окрашивания 0,2% раствором трипанового синего. К посадке и последующим исследованиям допускались образцы с содержанием живых клеток не менее 70%.

Статистическая обработка полученных данных: количество CD 105⁺ клеток в образце получали, подсчитывая среднее значение и среднеквадратическое отклонение данных, собранных в 10 полях зрения. Наличие статистически достоверной разницы устанавливали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В исходном состоянии клеточная суспензия костного мозга обоих пациентов содержала очень высокий процент жизнеспособных клеток (90-96%), которые активно росли и делились в условиях *in vitro*, образуя монослой или более плотные клеточные структуры.

Наши данные показали, что рост численности клеточной популяции стал результатом раз-

множення МСК (Рис. 1, 2). В частности установлено, что численность CD105⁺ клеток возросла в контрольных образцах соответственно в 120 (Таблица 1) и в 43 раза (Таблица 2).

На 14 сутки конфлюэнтность достигала 80-90% (Рис. 1, 2). На этой стадии культуральные образцы были зафиксированы для количественной оценки содержания МСК костного мозга.

Таблица 1.
Содержание МСК костного мозга в культуре (пациент А., 57 лет).

Группа	Содержание CD105 ⁺ клеток (в поле зрения)	
Контроль (исходный материал)	6,7 ± 3,8	18%
Контроль 14 суток	810,0 ± 21,80*	81%
Церебрал 0,2% 14 суток	272,0 ± 13,00*	87%

P < 0,05

Таблица 2.
Содержание МСК костного мозга в культуре (пациент С., 45 лет).

Группа	Содержание CD105 ⁺ клеток (в поле зрения)	
Контроль (исходный материал)	20,8 ± 2,22	33%
Контроль 14 суток	912,5 ± 17,73*	92%
Церебрал 0,2% 14 суток	876,0 ± 18,18*	88%

* *P* < 0,05

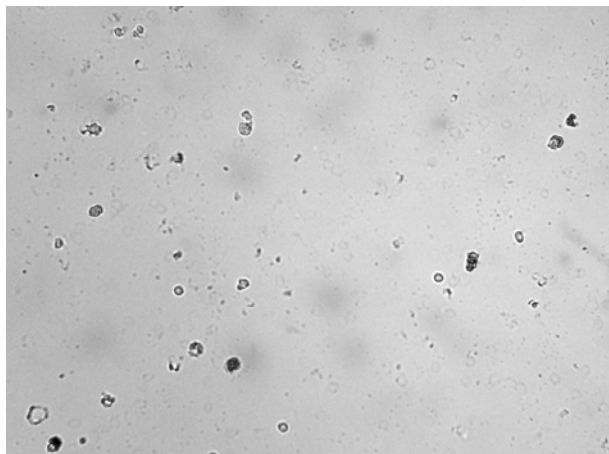


Рис. 1 CD105⁺ клетки костного мозга. Контроль 1 сутки в культуре. Об. 20x10.

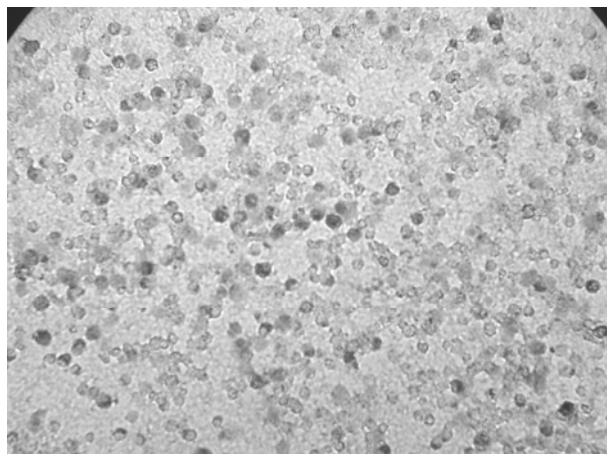


Рис. 2 CD105⁺ клетки костного мозга. Контроль 14 сутки в культуре. Об. 20x10.

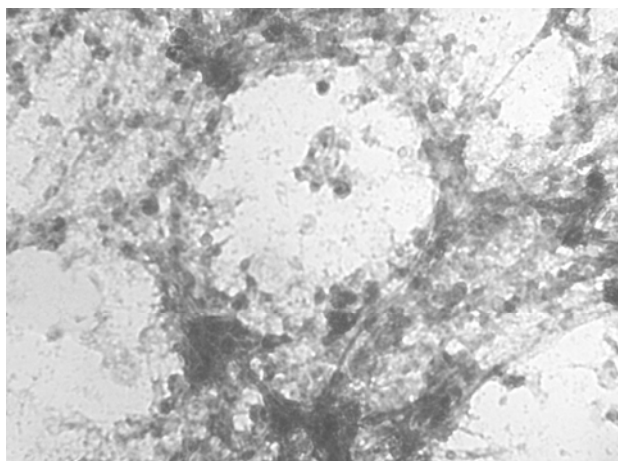


Рис. 3 CD105⁺ клетки костного мозга. 14 сутки в культуре. С использованием 0,2% раствора Церебрал. Об. 20x10.

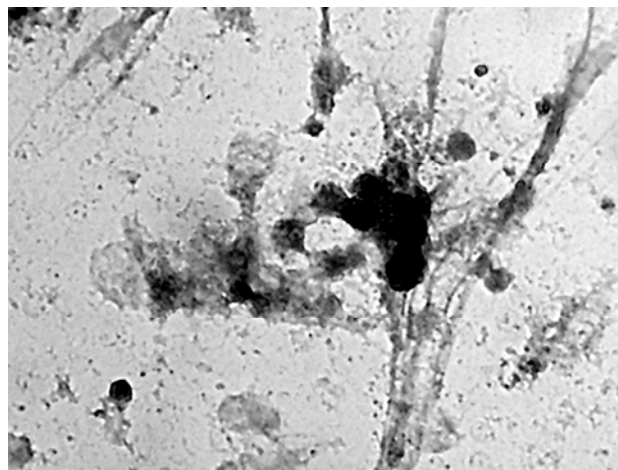


Рис. 4 CD105⁺ клетки костного мозга. 14 сутки в культуре. 10% церебрал. Об. 40x10.

Заключення

Полученные нами результаты свидетельствуют, что структура МСК монослоя была равномерной. Клетки небольшого размера, округлой формы без отростков. Эти данные свидетельствуют о преобладании пролиферативных процессов в культивируемых клетках. За период культивирования численность CD105⁺ клеток резко выросла в контрольных образцах, их процентное содержание в клеточной популяции увеличилось с 18 до 81%.

Под воздействием молекул средства Церебрал содержание CD105⁺ клеток увеличилось в 40 раз, при этом они составили в среднем 87% растущей общей клеточной популяции. Плотность сформированного монослоя была меньше, однако при этом он был структурирован – отростки клеток имели направленный рост, образующий ячеистую структуру, сетевую упорядоченную мультিকлеточную систему. Следует подчеркнуть, что растущие в культуре клетки имели большое количество отростков и по морфологическим признакам напоминали созревающие и сформированные мезенхимальные клетки. Таким образом, Церебрал оказывает выраженное влияние на рост и развитие мезенхимальных клеток костного мозга, которое состоит в существенном превалировании клеточной дифференциации над пролиферативными процессами. Ранее эта закономерность была

установлена во время экспериментов *in vitro* на клетках РС – 12 [4,8].

Литература

1. Gerson S.L. Hematopoietic recovery after coinfection of autologous blood stem cells and culture-expanded marrow MSC in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy / S.L.Gerson, C B.W. Cooper [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2000. – V. 18. – № 2. – P. 307-316.
2. Мусина Р.А. Сравнительная характеристика мезенхимальных стволовых клеток, полученных из разных тканей человека / Р.А.Мусина, Е.С.Бекчанова, Г.Т. Сухих // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – № 2. – С. 89-95.
3. Матийцев Н.П. Влияние церебрала и митохондрина2 на жизнеспособность и динамику развития дегенеративных изменений в ткани мозга мутантов *Drosophila melanogaster* / Н.П.Матийцев, Я.И.Черник // Биофармацевтический журнал. – 2012. – Т. 4. – № 4. – С. 54-56.
4. Погорелая Н.Х. Влияние церебрала, верапамила и их комбинаций на морфологическую дифференцировку клеток фехроцитомы крыс / Н.Х.Погорелая, С.И.Савосько, Д.А. Василенко // Нейрофизиология. – 2011. – Т. 43. - № 2. – С. 18-28.
5. Gu Weidong Bone mesenchymal stromal cells stimulate neurite outgrowth of spinal neurons by secreting neurotrophic factors / Gu Weidong // Neurological Research. – 2012. – V. 34, № 2. – P. 172 – 180.
6. Jessian L. Munoz Feline bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) show similar phenotype and functions with regards to neuronal differentiation as human MSCs / Jessian L. Munoz, Steven J. Greco, // Differentiation. – 2012. – V. 84, №2. – P. 214 – 222.
7. Зубов Д.А. Цитокиновая регуляция репаративной регенерации костной ткани культивируемыми мезенхимальными стволовыми клетками / Д.А.Зубов, В.М.Оксимец // Травма. – 2008. – Т. 9, № 2 – С. 145 – 153.
8. Зинькова Н.Н. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток / Н.Н. Зинькова, Е.Г. Гитлерович, И.Б. Соколова [и др.] // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 7. - С. 566 – 575.

Реферат

ВПЛИВ АНТИІНСУЛЬТНОГО ПРЕПАРАТУ ЦЕРЕБРАЛ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ І ДИФЕРЕНЦІАЦІЮ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ

Васильєва І.Г., Олексенко Н. О, Пусь А.С. , Макаренко О. М.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), кістковий мозок, Церебрал.

Проведені дослідження впливу антиінсультного препарату Церебрал на мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), отримані із тканин кісткового мозку людини. Встановлено, що молекули, які входять до складу препарату Церебрал, достовірно впливають на процеси проліферації і диференціації клітинної лінії МСК кісткового мозку. Виявлено збільшення клітинних популяцій і направлений клітинний ріст стовбурових клітин кісткового мозку. Під дією Церебралу вміст CD 105⁺ клітин збільшився в 40 разів, при цьому вони становили 87% клітинної популяції. Щільність сформованого моношару була менша, але при цьому він був структурований – відростки клітин мали направлений ріст, утворюючи лункоподібну структуру.

Summary

EFFECT OF ANTI-STROKE MEDICINE “CEREBRAL” ON PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL CELLS OF BONE MARROW

Vasyliieva I., Oleksenko N., Pus' A., Makarenko O.

Key words: mesenchymal stem cells (MSC), bone marrow, Cerebral.

This paper focuses on the studies of the impact produced by anti-stroke medicine “Cerebral” on mesenchymal cells taken from human bone marrow. It has been found that molecules of Cerebral definitely have an impact on processes of proliferation and differentiation of cell line of mesenchymal stem cells (MSC) in human bone marrow. It results in the increase of this cell population and directed stem cell growth. Under the cerebral influence CD105⁺ cells content has increased in 40 times, and they compose 87% of cell population. The density of new-formed monolayer is less, but structured as the cell processes have directed growth forming the socket-like structure.