

УДК 61:577.1

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

ВЛИЯНИЕ АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО СРЕДСТВА МИТОХОНДРИНА НА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ

ГУ «Институт нейрохирургии НАМНУ им. акад. А.П.Рамаданова»
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

Проведены исследования возможного влияния антигипоксического средства митохондрина на мезенхимальные стволовые клетки (МСК), полученные из жировой ткани и костного мозга. Установлено, что молекулы средства Митохондрина (0,1 мк/кг однократно) достоверно не влияют на процессы и метаболизм клеток обеих линий МСК различного происхождения.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК), костный мозг, жировая ткань, маркеры, митохондрин.

Введение

В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на новом разделе медицины – выделении и накоплении аутологичных МСК, обладающих значительным регенеративным потенциалом. Ранее основным источником МСК в организме взрослого донора служил костный мозг, но впоследствии источником аутологичных МСК стали жировая ткань, кожа, тимус, ткань пуповина и плацента, и некоторые другие. Эти ткани более доступны для выделения МСК, а содержание последних в них не только не уступает, но в некоторых случаях и превосходит костный мозг [3]. В группу МСК человека относят клетки с положительным иммунофенотипом, оцениваемым по следующим маркерам - CD2, CD29, CD44, CD49, CD54 CD73, CD90, CD105, CD166, при этом все культивируемые МСК экспрессируют значительное количество молекул HLA-I и виментина [4]. Экспрессия ряда выявляемых молекул - маркеров МСК (CD54, CD105, CD106, CD117) варьирует в широких пределах и зависит в первую очередь от стадии роста культуры. Поэтому необходимо подчеркнуть, что на сегодняшний день иммунологический статус МСК не исследован и во многом остается дискуссионным, а наличие МСК в клеточной популяции исследуют по наличию 2 маркеров - CD90- или CD105. Тем не менее имеющаяся методическая база позволяет использовать культивируемые МСК в качестве тестовой системы для изучения влияния лекарственных средств и препаратов на регенеративный потенциал клеток организма. В данном исследовании с этой целью использовался инвазивный органеллопрепарат, полученный из митохондрий нерожденных млекопитающих, обладающих антигипоксическим и нейропротекторным действием [5,6].

Объект и методы исследования

Исследования выполняли на клеточном материале, полученном из тканей организма во время хирургических операций (ампутация нижних конечностей и липосакция) в городских больницах №4, №8 и в областной клинической больнице города Киева. Донорами клеточного

материала стали 3 мужчин в возрасте от 38 до 64 лет.

Приготовление растворов митохондрина: основную часть митохондрина получали из лиофилизованного концентрата путем разведения стерильным физиологическим раствором при 4°C, осторожно перемешивая до полного растворения осадка. В дальнейшей работе полученный раствор разводили культуральной питательной средой до концентрации 1 и 10% и вносили в тестируемые образцы.

Свежие порции митохондрина вышеуказанных концентраций вносили по мере замены питательной среды в культуральных образцах.

Выделение и культивирование МСК (мезенхимальных стволовых клеток) из костного мозга: 20-25 мл аспирата костного мозга в стерильных условиях извлекали из бедренной кости путем использования пункционной иглы. Аспират смешивали с 2 объемами раствора Хэнкса (РАА, Австрия) и центрифугировали при 900g на протяжении 10 мин с целью получения осадка и супернатанта[1].

Полученный осадок разделяли в градиенте плотности (1,073 г/мл) перколла (Sigma, Германия), а клеточную плотность – $1-2 \times 10^7$ кл/мл. Данный градиент центрифугировали в течение 30 мин. при 900g. Осажденные таким образом мононуклеарные клетки ресуспендировались в растворе Хэнкса и центрифугировались в течение 10 мин при 460g [1].

Полученный клеточный осадок повторно ресуспендировали в среде Игла в модификации Dulbecco с низким содержанием глюкозы (РАА, Австрия), обогащенной 10% фетальной телячьей сывороткой (РАА, Австрия), целью получения клеточной концентрации 1×10^6 в чашке Петри диаметром 100 мм. Клеточную суспензию помещали в инкубатор (УЛИ-20, Украина) при 37°C, с содержанием CO₂ в среде 5%. Через 24ч надосадок отбирался, при этом адгезированную фракцию подвергали дальнейшему культивированию. В опытные образцы добавляли 10% раствор тестируемого средства. Культивирование клеток проводили на протяжении 14 суток с обязательной заменой питательной среды через 3-4 суток.

Выделение и культивирования МСК из жирово-

вой ткани: аспират жировой ткани, полученный при проведении большим липосакции, промывали раствором Хэнкса (РАА, Австрия) для удаления клеток крови и снижения в ткани содержания лекарственных препаратов для анестезии.

Для получения клеточной фракции из экстракционного матрикса ткань обрабатывали 0,075% раствором фермента коллагеназы (Sigma, Германия) на протяжении 30 мин (температура +37 °С). Затем коллагеназу инактивировали смесью равных объемов среды Игла с добавлением средства Dulbecco (DMEM) (РАА, Австрия), обогащенной 10% фетальной телячьей сывороткой (РАА, Австрия) [2].

Полученную смесь центрифугировали в течение 10 мин на центрифуге (Опн-8, Россия) при 250g. Клеточный осадок ресуспендировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы и обогащенной 10% фетальной телячьей сывороткой, а затем разливали в стерильные чашки Петри [2].

Плотность посадки клеток составляла не менее 1×10^6 клеток на чашку Петри диаметром 100мм. Последнее культивирование проводили в в инкубаторе (УЛИ-20, Украина) при 37°С, содержанием CO₂ в среде составляло 5%. Через 24ч в убирали надосадок, а адгезированную фракцию клеток оставляли для дальнейшего культивирования, при этом в опытные образцы добавляли 10% раствор тестируемого средства митохондрина. Культивирование проводили на протяжении 14 суток с заменой питательной среды через 3-4 суток.

Иммуногистохимическое выявление CD-105⁺ изучаемых клеток производили следующим образом: По окончании периода культивирования культуральные клеточные образцы фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma, Германия) при температуре +4 °С. При этом использовались первичные мышиные антитела к CD-105 человека (Dako, Дания) в разведении 1:20. Визуализацию связывания антител проводили с помощью стандартных реактивов системы HRP/DAB Detection System (Dako, Дания), а подсчет количества CD 105⁺ клеток проводился на отдельных образцах в 10 полях зрения светового микроскопа СМ-15 (ЛОМО, Россия).

Оценка жизнеспособности клеточной МСК популяции: проводилась перед началом посадки клеток для культивирования. С этой целью подсчитывалось содержание в клеточной суспензии мертвых клеток после их предварительного окрашивания 0,2% раствором трипанового синего. К посадке допускались клеточные образцы с содержанием жизнеспособных клеток в количестве не менее 70%.

Результаты и их обсуждение

Культуры МСК костного мозга и жировой ткани были использованы для изучения действия антигипоксического средства митохондрина (M2). В частности, целью исследования было

выяснить, обусловлены ли антигипоксические эффекты, вызываемые средством митохондрина, стимуляцией МСК или в механизме их фармакологического действия задействованы другие механизмы.

В исходном материале жировой ткани человека содержание CD105⁺ клеток составляло только 0,05% от их общего числа (Таблица 1), при этом данная клеточная популяция отличалась достаточно высокой жизнеспособностью и содержала 85% живых клеток. Если в начале исследования адгезивная фракция составляла 7,4 %, на 3 сутки культивирования колонии практически отсутствуют, преобладают единичные клетки [7].

На 14 сутки эксперимента культуру клеток фиксировали, а затем окрашивали для выявления МСК. Полученные результаты показали, что численность стволовых клеток за период культивирования увеличилась в 5 раз (Таблица 1) и достигла 0,25% в клеточной популяции. При этом содержание МСК в контрольных и опытных образцах практически не отличалось, т.е. митохондрина не влиял на активность пролиферативных процессов данного типа МСК.

Таблица 1
Содержание МСК жировой ткани в культуре

Группа	Содержание CD105 ⁺ клеток в поле зрения, %
Контроль (исходный материал)	0,05 ± 0,017
Контроль 14 суток	0,25 ± 0,083
M1 10% раствор 14 суток	0,23 ± 0,077

В поле зрения микроскопа CD105⁺ клетки жировой ткани человека представляли собой мелкие или средние клетки округлой, иногда зерновидной формы с крупным ядром и узким перинуклеарным ободком цитоплазмы. Иногда эти клетки образовывали небольшие колонии, но преимущественно встречались единичные клетки (Рис. 1, 2). При использовании 10% раствора средства митохондрина в поле зрения наблюдалось равномерное распределение изолированных и жизнеспособных МСК CD-105⁺ (рис. 1).

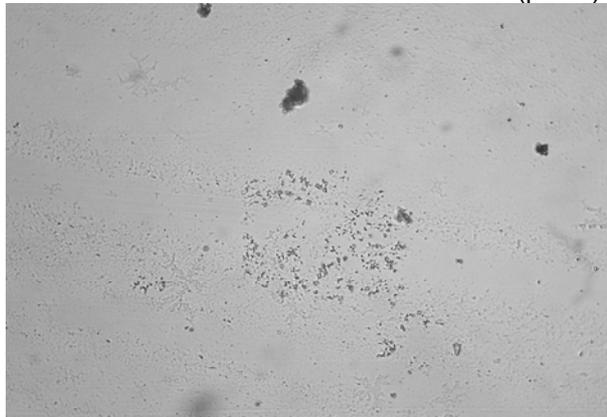


Рис. 1 CD105⁺ клетки жировой ткани. Контроль 14 суток в культуре, Об 10x10.

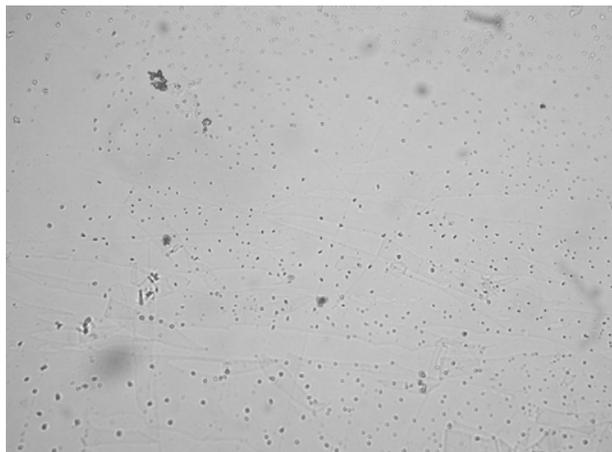


Рис. 2 Отдельные CD105⁺ клетки жировой ткани. 14 суток в культуре. Добавлен 10% раствор M1, Об 20x10.

В исходном материале ткань костного мозга человека содержит 1% CD105⁺ клеток МСК (Таблица 2). Общая жизнеспособность клеток данной ткани была очень высокой – 98% клеток в суспензии отторгали витальный краситель, а адгезивная клеточная фракция составила 39%.

Таблица 2.
Содержание МСК CD-105⁺, извлеченных из костного мозга в культуре

Группа	Содержание CD105 ⁺ клеток в поле зрения, %
Контроль (исходный материал)	1,00 ± 0,022
Контроль 14 суток	1,67 ± 0,056
M1 10% раствор 14 суток	1,43 ± 0,047

За период двухнедельного культивирования количество CD105⁺ клеток возросло в 1,7 раза (Таблица 2). Как и в жировой ткани эти клетки характеризовались мелкими и средними размерами для них типичными, крупное округлое ядро и небольшой ободок цитоплазмы (Рис. 3). МСК располагались преимущественно на поверхности стромальных клеток, которые, расплываясь, формировали клеточный монослой, клеточные колонии встречаются крайне редко (Рис. 3). В опытных сериях встречались не только единичные МСК, но и колонии различного размера, на процесс образования которых может оказывать митохондрин (Рис. 4). В то же время наши данные показывают, что под воздействием антигипоксического средства митохондрина количество CD105⁺ клеток увеличивается, т.е. их процентное содержание статистически не отличается от значений, полученных при изучении контрольной группы (Таблица 2). Таким образом митохондрин не оказывает пролиферативного действия на обе культуры МСК, выделенных из различных тканей организма.

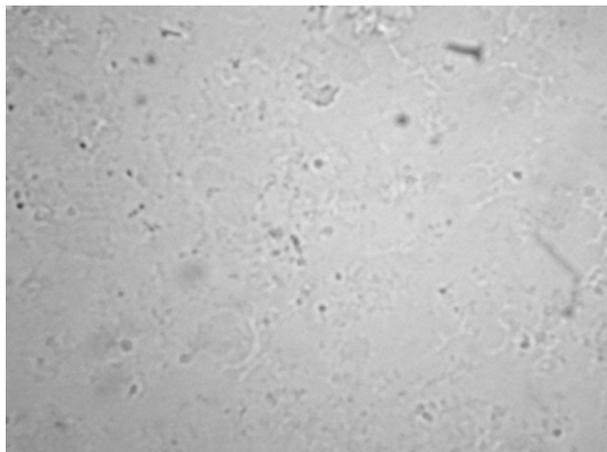


Рис. 3 CD105⁺ клетки костного мозга 14 суток культивирования. Контроль. Об. 20x10

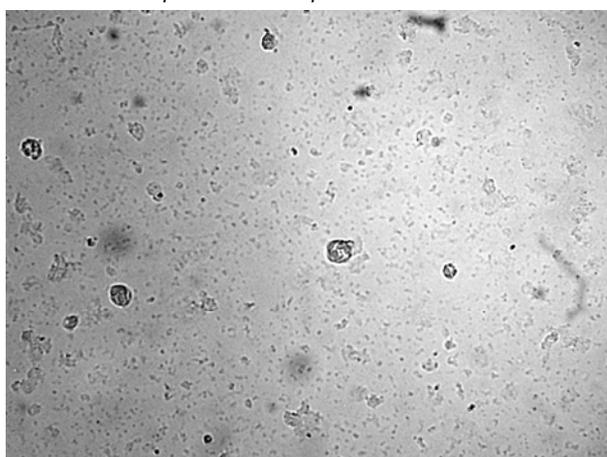


Рис. 4 CD105⁺ клетки костного мозга 14 суток в культивирования после добавления 10% раствора M1. Об. 10x10

Заключение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что МСК человека из жировой ткани и костного мозга не вовлечены в механизм действия антигипоксического средства митохондрина, который может быть отнесен к новому классу лекарственных препаратов – трофинотропинов. Скорее всего, вызываемые данным средством эффекты опосредованы другими циторцепторными и метаболическими реакциями. Достоверно известно, что трофинотропины не обладают выраженным действием на пролиферативную активность милигнизированных клеток [7], что делает их потенциально важными и перспективными лекарственными средствами при лечения онкогенетических процессов.

Литература

1. Кос О.Н. Hematopoietic recovery after coinfusion of autologous blood stem cells and culture-expanded marrow MSC in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy / Кос О.Н., Gerson S.L., Cooper B.W. [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2000. – V. 18, № 2. – P. 307-316.
2. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration / Mizuno H. // J. Nippon. Med. Sch. - 2009. – V. 76, № 2. – P. 56-66.

3. 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.
4. Савченкова И.П. Подкожно-жировая ткань человека, подвергнутая низкотемпературному шоку, как источник жизнеспособной клеточной популяции с характеристиками мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / И.П.Савченкова, С.В.Коржикова // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 8. – С. 621-627.
5. Shirobakova L.I. Autohoxic activity of a new organollogenic pharmacological drug "Mitochondrin" / L.I. Shirobakova // Book of Articles. Proc. of the 1st World Cougr of the Ins.Soc. of Physical and Rehab.Medicine (ISPRM). – 2001. – Monduzzi Edit.S.T.A. - №1. – P.743-746.
6. Матийцев Н.П. Влияние церебрала и Митохондрина на жизнеспособность и динамику развития дегенеративных изменений в ткани мозга мутантов *Drosophila melanogaster* / Н.П.Матийцев, Я.И. Чернин // Биофармацевтический журнал. – 2012. – Т. 4, № 4. – С. 54-56.
7. Погорелая Н.Х. Влияние церебрала, верапамила и их комбинаций на морфологическую дифференцировку клеток фаехроматоциты крыс / Н.Х.Погорелая, С.И.Савосько, Д.А. Василенко // Нейрофизиология. – 2011. – Т. 43, № 2. – С. 18-28.

Реферат

ВПЛИВ АНТИГІПОКСИЧНОГО ЗАСОБУ МІТОХОНДРИНУ НА МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, ЩО ОТРИМАНІ ІЗ РІЗНИХ ТКАНИН

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

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), кістковий мозок, жирова тканина, маркери, мітохондрії.

Проведені дослідження можливого впливу антигіпоксичного засобу Мітохондрину на мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), що отримані із жирової тканини і кісткового мозку. Встановлено, що молекули засобу Мітохондрину (0,1 мл/мг одноразово) достовірно не впливають на процеси і метаболізм клітин обох ліній МСК різного походження.

Summary

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

Vasylijeva I., Oleksenko N., Pus' A., Makarenko A.

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.

УДК: 611.018.73/74

Гасюк Н.В., Худякова М.Б., Герасименко С.Б.

ОСОБЛИВОСТІ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЇ БУДОВИ ЕПІТЕЛІЮ ЯСЕНЕВОЇ БОРОЗНИ

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава;

Харківський національний медичний університет, м. Харків

Приведені в статті результати дослідження розширюють та доповнюють існуючі дані стосовно будови епітеліоцитів ясеневі борозни та дають можливість вважати її першою мішенню антигенного впливу мікробних чинників та їх токсинів на етапі виникнення запального процесу в тканинах пародонта. Оскільки це є особливий вид епітелію зі специфічним цитотопографічним співвідношенням та ультраструктурною організацією.

Ключові слова: епітелій, ясенева борозна, пародонт, ультраструктура.

Робота є фрагментом проекту науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики «Роль запальних захворювань зубо-щелепного апарату в розвитку хвороб, пов'язаних із системним запаленням», номер державної реєстрації №0112U0011538. Автор є співвиконавцем даного проекту.

Проблема реабілітації пацієнтів з дефектами зубних рядів є одним із актуальних завдань практичної стоматології, так як 65% населення нашої країни у віці 35-45 років потребує зубного протезування [5,9].

Застосовувані для цієї мети традиційні методи заміщення дефектів зубних рядів не завжди в повній мірі відповідають естетичним і функціональним вимогам пацієнтів [3].

Впровадження дентальної імплантації в практику ортопедичної стоматології та застосування імплантатів в якості самостійних або додаткових опор для зубних протезів відкриває перспективи

успішного лікування пацієнтів з виготовленням незнімних та умовно-знімних конструкцій зубних протезів [1,10].

Термін служби незнімних конструкцій залежить від стану тканин пародонту опорних зубів і стану тканин, що оточують імплантат [2], так як саме ці ділянки слизової підлягають впливу механічних, термічних та бактеріальних чинників [5,7,8,14].

Провідна роль у виникненні запальних реакцій в тканинах пародонту належить мікробному чиннику [4,15]. Під впливом патогенної мікрофлори зубної бляшки відбувається активація