– гравилат городской (*Geum urbanum L.*). В составе данного компонента обнаружены дубильные вещества (до 30%), гликозид геин, горькое вещество, флавоны, эфирное масло с гвоздичным запахом (0,1%), углеводы (крахмал, сахароза, глюкоза, арабиноза), смолы; листья содержат флавоновые гликозиды, аскобиновую кислоту (до 129 мг%);

– лапчатка прямостоячая (*Potentilla erecta (L.) Hampe*). В корневищах данного компонента обнаружены дубильные вещества (до 35%), гликозид торментиллин, эфир торментол, хинная и эллаговая кислоты, флорафен, воск, смолы, камедь, крахмал, эфирное масло, сахара, макроэлементы (K – 6,10 мг/г, Ca – 7,40 мг/г, Mg – 0,8 мг/г, Fe – 0,4 мг/г) и микроэлементы (Mn – 2,5 мкг/г, Cu – 1,04 мкг/г, Zn – 2,02 мкг/г, Se – 6,7 мкг/г);

– ива белая (*Salix alba L.*) оказывает противовоспалительное, антисептическое, тонизирующее, анальгезирующее и кровоостанавливающее действие;

– зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum*). Порошок травы растения используют для заживления ран и пролежней;

– чистотел большой (*Chelidonium majus*) оказывает ранозаживляющее, противовоспалительное, антисептическое действие; используется при лечении псориаза, экземы, чесотки, туберкулеза кожи, трудно заживающих ран, волчанки;

– золотарник обыкновенный (*Solidago virgaurea*) применяется для лечения дерматологических заболеваний, ран и ожогов, туберкулеза кожи;

– алтей лекарственный (*Althaea officinalis*) облегчает самопроизвольную регенерацию тканей, оказывает противовоспалительное действие; корни, в виде порошка, используют для лечения туберкулеза кожи, ожогов, ран [5].

Таким образом, способ получения крахмалопродуктов, на основе нативных и модифицированных полисахаридов (крахмала, пектина, целлюлозы), обладающих широким или узконаправленным спектром антибактериальной активности, может найти применение в медицине в качестве антибактериального и/или ранозаживляющего средства для оказания первой медицинской помощи при проникающих, колото-резанных ранах, ожогах, воспалительных заболеваниях кожи, для обработки слизистых оболочек и т.д.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев, Н. Р. Основы производства нативных крахмалов / Н.Р. Андреев. – М.: Изд. «Пищепромиздат», 2001. – 289 с.
2. Ловкис, З. В. Технология крахмала и крахмалопродуктов: Учеб. пособ. / З.В. Ловкис, В.В. Литвяк, Н.Н. Петюшев; РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию». – Минск: Асобный, 2007. – 178 с.
3. Асецкая, И. Л. Взаимодействие антибиотиков с препаратами других групп // Пульмонология и аллергология. – 2003. – № 4. – С. 20-24.
4. Яковлев, В. П. Рациональная фармакотерапия: в 3 т. Т.1: Рациональная антимикробная фармакотерапия / В.П. Яковлев. – М.: ЛитТерра, 2003. – 1008 с.
5. Сафонов, Н. Н. Атлас лекарственных растений. 900 домашних рецептов, которые помогут обрести здоровье / Н. Н. Сафонов. — М.: Издательство «Э», 2016. — 312 с.

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА НА МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ *IN VITRO* INFLUENCE OF CHOLECALCIFEROL ON ADIPOSE-DERIVED MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS *IN VITRO*

А. А. Царик, М. В. Лобай, М. Ю. Юркевич
A. Tsarik, M. Labai, M. Yurkevich

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
czarik01@inbox.ru

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Проведено исследование влияния холекальциферола в различных концентрациях на морфологию, жизнеспособность и пролиферативный потенциал культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани лабораторных животных. Показано, что в присутствии холекальциферола сохраняется достаточно высокая жизнеспособность, морфологическая гомогенность и высокий пролиферативный потенциал клеток.

The effect of cholecalciferol on the morphology, viability and proliferative potential of rat adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells was presented. It was shown that a high cell viability, morphological homogeneity and high proliferative potential of cell culture were in the presence of various concentration of cholecalciferol.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, жировая ткань, холекальциферол, культуры клеток, морфология.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, adipose tissue, cholecalciferol, cell culture, morphology.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-194-197>

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (далее – ММСК) представляют собой популяцию клеток взрослого организма с уникальными свойствами, включающими самообновление, дифференциацию в направлении ряда соматических клеточных линий (миоциты, остециты, клетки нервной системы и т.д.), иммуномодулирующие, ангиогенные, антиапоптотические и регенеративные способности. ММСК способны мигрировать к месту повреждения, закрепляться, дифференцироваться и осуществлять функцию замещенных клеток. В связи с этим, ММСК рассматриваются как универсальный клеточный материал в различных областях регенеративной медицины. Кроме того, терапевтический эффект трансплантации ММСК, доказанный в многочисленных доклинических и клинических исследованиях, связан не только с дифференцировкой клеток, но и со способностью ММСК проявлять выраженные иммуномодулирующие свойства [1]. При проведении аллогенной или ксеногенной клеточной трансплантации не наблюдается иммунологической реактивности организма и ММСК не лизируются цитотоксическими Т-лимфоцитами и натуральными киллерами. При этом в исследованиях *in vitro* выявлены иммуносупрессивные свойства ММСК за счет активации популяций регуляторных Т-лимфоцитов и/или подавления клеточной пролиферации путем усиления ингибиторов клеточного синтеза и продукции растворимых факторов (трансформирующий ростовой фактор (TGF), ростовой фактор гепатоцитов (HGF), простагландин E2 (PGE2), индолеамин 2,3-диоксигеназа (IDO) и другие). На экспериментальных моделях, а также в клинических исследованиях показано, что при аллогенных трансплантациях ММСК снижают вероятность развития реакции «трансплантат против хозяина», также ММСК эффективно подавляют функциональную активность аутореактивных клонов клеток при аутоиммунных патологиях (например, при рассеянном склерозе) [2].

Источниками ММСК могут служить клетки пуповинной крови, плаценты, костного мозга, жировой ткани. На сегодняшний день особый интерес вызывают стволовые клетки, полученные из жировой ткани. Выделяют две фракции жировой ткани: собственно зрелые адипоциты и более плотную клеточную массу, которой впоследствии дали термин «стромально-сосудистой фракция». Данная фракция гетерогенна и представлена клетками крови, фибробластами, перицитами, преадипоцитами, эндотелиальными клетками. Множество исследований показывают, что именно стромально-сосудистая фракция является огромным резервуаром ММСК, способных к дифференциации в различных направлениях. Немаловажным достоинством жировой ткани как источника ММСК является относительная легкость выделения и возможность получения клеточной массы из жировой ткани в достаточно большом количестве [1].

Холекальциферол (витамин Д3) является стероидным гормоном, играющим ключевую роль в гомеостазе кальция и минерализации костной ткани, а также оказывающим плеiotропный эффект на различные типы клеток. Рецепторы к холекальциферолу обнаружены на гладкомышечных клетках кровеносных сосудов, эндотелиоцитах и кардиомиоцитах. Установлено, что ММСК экспрессируют рецепторы к холекальциферолу, а также имеют гидролазы, метаболизирующие данный гормон. Кроме того, доказана роль различных концентраций холекальциферола *in vivo* и *in vitro* в регуляции способности ММСК дифференцироваться в клетки различных линий, в первую очередь в остециты и адипоциты. В исследованиях *in vitro* показано, что ММСК совместно с холекальциферолом подавляет сигнальные пути трансформирующего ростового фактора- β при канцерогенезе. В присутствии витамина Д3 наблюдается значительное повышение иммуносупрессивных свойств ММСК, в том числе в отношении провоспалительной популяции Т-хелперов-17. Обнаружено, что при добавлении холекальциферола клеточные культуры начинают активно продуцировать ряд биологически активных веществ, обеспечивающих влияние ММСК на клетки иммунной системы, в частности на макрофаги. Эффект холекальциферола на дифференцировочный потенциал и иммуномодулирующие свойства ММСК может учитываться при разработке различных подходов к клеточной терапии [3 – 5].

Цель работы заключалась в оценке влияния различных концентраций холекальциферола на морфологию, жизнеспособность и пролиферативный потенциал культур ММСК жировой ткани лабораторных животных.

Экспериментальное исследование проводили с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в научных целях (Страсбург, 1991 г.), и в соответствии с постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 21.05.2010 №36 «Ветеринарно-санитарные правила по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках».

Объектом исследования явились культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенные из жировой ткани 3 беспородных половозрелых лабораторных крыс с массой тела 270 – 320 г. На фоне тиопенталового наркоза (интракардиальное введение 45 мг тиопентала натрия/кг веса) осуществлялась продольная лапаротомия крыс и забор абдоминальной жировой ткани. Для выделения клеток использовали сочетание механической и ферментативной дезагрегации. Для этого образцы ткани тщательно измельчали до эксплантов размером 2 – 3 мкм в 0,075% растворе коллагеназы IV типа («Sigma», Германия) и инкубировали в течение 60 мин при 37°C в условиях постоянного перемешивания. Ферментативную активность инактивировали путем

центрифугирования полученной суспензии в физиологическом растворе с 10% инактивированной фетальной бычьей сывороткой («Capricorn Scientific», Германия) в течение 10 минут при 1500 об/мин. В дальнейшем для удаления конгломератов и клеточного дебриса использовали кратковременное центрифугирование (1 мин, 1500 об/мин.). Клеточную суспензию высевали в адгезивные чашки Петри в полную культуральную среду DMEM (минимальная среда Игла с низким содержанием глюкозы, модифицированная по способу Дульбекко, «Gibco», США), содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, смесь антибиотика – антимикотика (100 Ед/мл бензилпенициллин натрия, 100 Ед/мл стрептомицин сульфата, 100 Ед/мл неомицин сульфата, «Lonza», США). Клетки культивировали при 37°C в условиях 5% CO₂. Первая замена полной культуральной среды осуществлялась на 2 день культивирования, впоследствии среда заменялась каждый 3 день.

При достижении монослоем 90% конфлюэнтности клетки переводили в суспензию за счет инкубации культур с 0,25% раствором трипсин – этилендиаминтетрауксусной кислоты («Gibco», США) в течение 10 мин. при 37°C с последующим двукратным центрифугированием в физиологическом растворе (10 мин., 1500 об/мин.).

К клеткам 2 пассажа (3x10⁵ клеток/лунку 24-луночного планшета) добавляли холекальциферол в конечных концентрациях 75 МЕ/мл, 38 МЕ/мл и 19 МЕ/мл с последующим культивированием в течение 5 дней в стандартных условиях.

Жизнеспособность оценивали путем добавления к культурам клеток флуоресцентного красителя 4',6-диамиидно-2-фенилиндол (1 мкг/мл DAPI, «Sigma», Германия), окрашивающего ядра погибших ММСК и непроникающего через интактную плазматическую мембрану живых клеток. Для визуализации клеточных структур культуры фиксировали смесью Никифорова (смесь равных частей эфира и 96° спирта) и окрашивали гематоксилином и эозином. Мониторинг клеточных культур и оценку динамики роста проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа BS – 7000 («BestScope», КНР).

Статистическая обработка результатов осуществлялась в пакете прикладных программ STATISTICA 8.0. Результаты исследования представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25%÷75% процентиля). Для сравнения двух зависимых групп использовался непараметрический критерий Вилкоксона. Данные статистически значимо отличались при уровне значимости (p) меньше 5% (0,05).

Выделенные путем механической и ферментативной диссоциации жировой ткани клетки в течение 24 часов культивирования в полной питательной среде в стандартных условиях (5%CO₂, 37°C) адгезировались к лабораторному пластику. При этом, полученные первичные культуры характеризовались морфологической гетерогенностью и включали как фибробластоподобные клетки, так и клетки полигональной и округлой формы. К 5–7 суткам культивирования в первичных культурах преобладали активно пролиферирующие клетки с фибробластоподобной морфологией, типичной для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (рис. 1А).

Рисунок 1 – Морфология культур ММСК жировой ткани различного пассажа:
А – первичная культура, 5 день культивирования; Б – первый пассаж, 3 день культивирования;
В – 2 пассаж, 10 день культивирования (световая микроскопия, ув. 20х)

Начиная с первого пассажа наблюдалась морфологическая гомогенность культур (рис. 1Б и В). Клетки характеризовались веретеновидной фибробластоподобной морфологией с четко различимым ядром, ядрышками и цитоплазматической перинуклеарной зернистостью, что свидетельствует о выраженной секреторной активности.

Клетки также обладали способностью к колониеобразованию и высокой пролиферативной активностью, что приводило к формированию к 18 – 22 дням культивирования монослоя с 90 – 100% конфлюэнтностью. При этом, способность клеток к активному делению сохранялась на протяжении всего срока наблюдения (0 – 3 пассажи). Жизнеспособность клеток, определяемая путем окрашивания культур флуоресцентным красителем DAPI, колебалась от 92% до 98% и составляла 96% (93%÷99%) по медиане.

Таким образом, клетки, выделенные путем механической и ферментативной дезагрегации жировой ткани лабораторных животных, соответствовали основным критериям идентификации ММСК (Международное общество клеточной терапии, г. Ванкувер, Канада, 2006 г.) и при культивировании в стандартных условиях характеризовались адгезивностью к пластику, типичной фибробластоподобной морфологией и экспансией *in vitro* с формированием гомогенных клеточных популяций.

Рисунок 2 – Морфология ММСК жировой ткани 2 пассажа на 5 день культивирования в стандартных условиях в присутствии различных концентраций холекальциферола: А – интактные ММСК; Б – при добавлении 75 МЕ/мл холекальциферола; В – 38 МЕ/мл холекальциферола; Г – 19 МЕ/мл холекальциферола (окраска гематоксилин-эозином, световая микроскопия, ув. 20х)

Для оценки влияния холекальциферола на морфологию и пролиферацию ММСК к культурам 2 пассажа (3×10^5 клеток/лунку 24-луночного планшета) добавляли исследуемое вещество в конечной концентрации 75 МЕ/мл, 38 МЕ/мл и 19 МЕ/мл. На 5 день культивирования в присутствии холекальциферола морфология ММСК не изменялись. Культуры сохраняли гомогенность и были представлены веретеновидными фибробластоподобными клетками, адгезированными к лабораторному пластику. Жизнеспособность ММСК при добавлении холекальциферола во всех исследуемых концентрациях не снижалась ниже 88%, составляла 94% ($91\% \div 97\%$) и статистически значимо не отличалась от аналогичного показателя в интактных культурах клеток (без добавления холекальциферола, 95% ($90\% \div 96\%$)).

Вне зависимости от концентрации холекальциферола все культуры ММСК обладали способностью к самоподдержанию и активному росту. Для характеристики пролиферативной способности ММСК рассчитывали число удвоения клеточных популяций (ЧУП) по следующей формуле, где n – число клеток после культивирования, N – число клеток для посева:

$$\text{ЧУП} = \log_{10}(n/N) * 3,33.$$

В присутствии 75 МЕ/мл холекальциферола ММСК характеризовались более выраженным пролиферативным потенциалом, о чем свидетельствует высокое количество клеток, генерируемых в культуре. Так, ЧУП интактных культур ММСК составляла 3,3 ($3,0 \div 3,5$) усл. ед. и статистически значимо не отличалась от аналогичного показателя в культурах, содержащих 75 МЕ/мл ($3,4$ ($2,9 \div 3,5$) усл. ед.), 38 МЕ/мл ($2,8$ ($2,6 \div 3,2$) усл. ед.) и 19 МЕ/мл ($3,0$ ($2,6 \div 3,2$) усл. ед.) холекальциферола.

Культуры ММСК в присутствии холекальциферола сохраняют высокую жизнеспособность (более 88%), морфологическую гомогенность, способность к адгезии и пролиферативный потенциал. Дальнейшие исследования влияния холекальциферола на дифференцировочный потенциал ММСК и их иммуномодулирующие способности открывают новые перспективы для развития клеточных технологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пронина, Е. А. Современные направления и перспективы развития регенеративной медицины / Е. А. Пронина, Э. Б. Попыхова, Т. Б. Степанова, А. Н. Иванов // Современные проблемы науки и образования. – № 4. – 2019. – С. 70 – 80.
2. Ren, G. Mesenchymal stem cell – mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide / G. Ren, L. Zhang, X. Zhao [et al.] // Cell Stem Cell. – 2008. – V. 2. – P. 141–150.
3. Valle, Y. L. Vitamin D machinery and metabolism in porcine adipose-derived mesenchymal stem cells / Y. L. Valle [et al.] // Stem Cell Res Ther. – 2016. – V. 7. – P.118 – 127.
4. Duffy, M. M. Mesenchymal stem cells and a vitamin D receptor agonist additively suppress T-helper 17 cells and related inflammatory response in the kidney / M. M. Duffy [et al.] // Am J Physiol Renal Physiol. – 2014. – V. 37. – P. 1412– 1426.
5. Klotz, B. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 treatment delays cellular aging in human mesenchymal stem cells while maintaining their multipotent capacity / B. Klotz [et al.] // PLoS One. – 2012. – V. 7. – P. 33 – 41.

СФЕРОИДНЫЕ КУЛЬТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ДИСПЕРГИРОВАНИЯ ТКАНИ ПЕЧЕНИ

HEPATOCYTES SPHEROID CULTURES OBTAINED BY LIVER ENZYMATIC DISPERSION

**М. Ю. Юркевич, П. В. Альховик, М. В. Лобай,
А. Д. Дубко, Д. Б. Нижегородова, М. М. Зафранская**
M. Yurkevich, P. Alchovik, M. Labai, A. Dubko, D. Nizheharodava, M. Zafranskaya

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
marija4567@gmail.com*

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Представлен оптимизированный метод выделения гепатоцитов, включающий механическое и ферментативное диспергирование ткани, фильтрование полученной суспензии и кратковременное низкоскоростное центрифугирование. Показано, что культивирование гепатоцитов на неадгезивном пластике способствует формированию сфероидов с многочисленными межклеточными связями, защищающими клетки от апоптотической гибели и тем самым поддерживающие жизнеспособность культур. При этом, изначальная высокая интенсивность хемилюминесценции гепатоцитов при культивировании снижается, что требует разработки дополнительных технологий поддержания функциональной стабильности клеток.

An optimized method for hepatocytes isolation including mechanical and enzymatic tissue dispersion, suspension filtration and short-term low-speed centrifugation is presented. It was shown that the cultivation of hepatocytes on non-adhesive plastic promotes the formation of spheroids with numerous intercellular bonds that protect cells from apoptotic death and support the viability of cultures. At the same time, the initial high intensity of hepatocyte chemiluminescence during cultivation decreases which requires the development of additional technologies to maintain the functional stability of cells.

Ключевые слова: гепатоциты, ферментативное диспергирование, сфероиды, морфология, жизнеспособность, хемилюминесценция.

Keywords: hepatocytes, enzymatic dispersion, spheroids, cell morphology, viability, chemiluminescence.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-198-201>

Печень является центральным метаболическим и синтетическим органом, участвующим в эмбриональном гемопоэзе, метаболизме углеводов (глюконеогенез, гликогенолиз), синтезе липидов и белков (альбумин, глобулин, факторы свертывания крови, трансферрин и др.), продукции желчных кислот, хранении гликогена и ретинола, детоксикации метаболитов, токсинов, гормонов и лекарственных средств. Кроме того, печень имеет высокую скорость самообновления и значительную способность к восстановлению после редукции до 80% массы органа [1]. Функциональная гетерогенность печени, а также способность после повреждения поддерживать свою структуру связаны с уникальными свойствами ее паренхиматозных эпителиальных клеток – гепатоцитов и холангиоцитов. Гепатоциты составляют 78% от объема печени и более чем 65% от числа клеток, при этом зрелые клетки находятся в состоянии покоя (G_0 – фаза клеточного цикла), но в ответ на повреждение или при удалении части печени запускаются механизмы, обеспечивающие пролиферацию гепатоцитов с целью компенсации погибших клеток [2].

Получение культур гепатоцитов является достаточно распространенной технологией, используемой в клеточной биологии, фармакологии и токсикологии для изучения метаболических процессов, оценки жизнедеятельности и функциональной активности клеток, исследовании фармакологического (токсического) действия различных факторов химической и физической природы, доклинической оценки эффективности гепатопротекторных средств [3]. В настоящее время рассматриваются возможности использования культур гепатоцитов в терапии острой печеночной недостаточности, хронических заболеваний печени, наследственных и приобретенных метаболических нарушений [2].

Основными проблемами культивирования гепатоцитов являются снижение выхода и жизнеспособности клеток при выделении, быстрая потеря в культурах кубоидной морфологии и специфических функций, аккумуляция актиновых волокон, приобретение фибробластоподобной морфологии, адгезивных свойств и гибель в течение нескольких дней [4]. Данные изменения связаны с ишемическим стрессом во время выделения клеток и их адаптацией к лабораторным условиям, а также с отсутствием условий для прикрепления гепатоцитов и формирования межклеточных контактов вследствие разрушения архитектоники ткани.