

3. Океанов, А. Е. 25 лет против рака. Успехи и проблемы противораковой борьбы в Беларуси // А.Е. Океанов, П.И. Моисеев, А.А. Евмененко, Л.Ф. Левин; под ред. О.Г. Суконко. – Минск: ГУ РНМБ, 2016. – 415 с.
4. Петерсон, Б.Е. Ранняя онкологическая патология// Б.Е. Петерсон, В.И. Чиссов. – М.: Медицина, 2001. – 290 с.
5. Роговская, С.И. Вакцинопрофилактика папилломавирусной инфекции и рака шейки матки: учеб. пособие // С.И. Роговская. – М.: Медицина, 2012. – 37 с.

**МОРФОЛОГИЯ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ**

**MORPHOLOGY AND PROLIFERATIVE POTENTIAL
OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL BONE MARROW
CELLS IN THE CONDITIONS OF HYPERGLICEMIA**

М. А. Кохнюк, М. В. Лобай
M. Kokhnyuk, M. Labai

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
mkokhnyuk01@mail.ru*

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

Проведено исследование влияния глюкозы в различных концентрациях на морфологию, жизнеспособность и пролиферативный потенциал культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга лабораторных животных. При культивировании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях высокого содержания глюкозы (до 25мМ) не наблюдается изменений в жизнеспособности, морфологических особенностях и пролиферативном потенциале клеточных культур.

The effect of glucose in various concentrations on the morphology, viability and proliferative potential of rat bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells was presented. When cultivating multipotent mesenchymal stromal cells under conditions of high glucose content (25 mM), no changes were observed in the viability, morphological features, and proliferative potential of cell cultures.

Ключевые слова: костный мозг, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, культивирование, глюкоза.

Keywords: bone marrow, multipotent mesenchymal stromal cells, cultivation, glucose.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-90-93>

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (далее – ММСК) представляют собой гетерогенную популяцию постнатальных клеток-предшественников стромального происхождения, которые могут быть выделены из различных тканей организма (костного мозга, жировой ткани, плаценты, пупочного канатика, пульпы молочного зуба, эндометрия, печени) и, наряду с регенеративным потенциалом, обладают выраженными как *in vitro*, так и *in vivo* иммуномодулирующими свойствами.

В лабораторных условиях ММСК обладают способностью к симметричному и асимметричному делению, высоким пролиферативным потенциалом, адгезивными свойствами, фибробластоподобной морфологией, выраженным дифференцировочным потенциалом. Под влиянием определенных факторов *in vitro* ММСК способны дифференцироваться во многие типы клеток мезодермального, эктодермального и энтодермального происхождения, включая эндотелиальные клетки, кардиомиоциты, гепатоциты и нейральные клетки, что открывает широкие возможности применения ММСК в регенеративной медицине [1].

Впервые ММСК были выделены А.Я. Фриденштейном из костного мозга за счет их способности к адгезии к поверхности лабораторного пластика. Клеточная популяция, выделенная таким способом, достаточно гетерогенна. Ее клетки различаются по своим дифференцировочным и пролиферативным потенциалам. Для более полной идентификации ММСК, изолированных из костного мозга человека, проведено большое количество исследований, направленных на определение профиля поверхностных антигенов клеток.

На сегодняшний день установлены следующие маркеры, экспрессируемые ММСК: SH-2, SH-3, SH-4, STRO-1, Sca-1, Thy-1, CD44, CD29, CD71, CD106, CD120a, CD124. Маркеры CD34, CD45 не экспрессируются, что отличает ММСК от гематopoэтических стволовых клеток [2].

Глюкоза является важным источником клеточной энергии и важным субстратом для синтеза белков и липидов. Глюкоза поступает в эукариотические клетки через два разных мембранно-ассоциированных белка-носителя, посредники переносчика глюкозы (GLUT) и переносчики глюкозы, связанные с Na^+ (SGLT). Глюкотоксичность или высокие концентрации глюкозы могут нарушать функцию β -клеток и в конечном итоге вызывать апоптоз. Повышенные концентрации глюкозы влияют на β -клетки поджелудочной железы и могут привести к окислительному повреждению в основных органах организма, таких как глаза, почки, нервы и кровеносные сосуды. По литературным данным, высокий уровень глюкозы индуцирует клеточное старение, тогда как снижение уровня глюкозы усиливает пролиферацию, уменьшает апоптоз [3].

ММСК, полученные из костного мозга, обладают потенциалом дифференцировки по нескольким направлениям и могут использоваться для лечения пациентов с сахарным диабетом. Тем не менее, высокий уровень глюкозы может отрицательно влиять на функцию ММСК. Повышенные концентрации глюкозы могут нарушить функциональную активность клеток, индуцировать развитие программированной клеточной гибели. Li и соавт. (2007) оценили влияние различных концентраций глюкозы на ММСК костного мозга *in vitro* и доказали, что пролиферация и остеогенная дифференцировка стимулируются высоким уровнем глюкозы. Kim и соавт. (2012) изучали влияние высокого уровня глюкозы на пролиферацию стволовых клеток и пришли к выводу, что высокий уровень глюкозы повышает скорость роста стволовых клеток [3].

Цель работы – оценка влияния различных концентраций глюкозы на морфологию, жизнеспособность и пролиферативный потенциал культур ММСК костного мозга лабораторных животных в условиях *in vitro*.

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 костного мозга 3 беспородных половозрелых лабораторных крыс с массой тела 270 – 320 г. На фоне тиопенталового наркоза (интракардиальное введение 45 мг тиопентала натрия/кг веса) осуществлялся забор большеберцовых и бедренных костей, которые впоследствии промывали физиологическим раствором. Мононуклеары костного мозга выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности Histopaque ($\rho=1,077\text{ г/см}^3$) («Sigma», Германия). Полученные кольца мононуклеаров дважды отмывали в фосфатном буфере PBS («Gibco», Германия), содержащем 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки («Cargison Scientific», Германия). Полученные суспензии клеток высевали на адгезивные чашки и культивировали в полной культуральной среде DMEM («Gibco», США), содержащей 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% CO_2 . Первая замена полной культуральной среды осуществлялась через 24 часа после посева, впоследствии среда заменялась каждый 3 день [4].

При достижении монослоем 80-90% конфлюэнтности, клетки переводили в суспензию за счет инкубации культур с 0,25% раствором трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты в течение 10 мин. при 37°C с последующим двукратным центрифугированием в физиологическом растворе (10 мин., 1500 об/мин.).

К клеткам 2 пассажа ($2,7 \times 10^5$ клеток/лунку 24 – луночного планшета) добавляли глюкозу в конечных концентрациях 5 мМ, 10мМ и 25мМ с последующим культивированием в течение 5 дней в стандартных условиях.

Жизнеспособность ММСК после культивирования с глюкозой оценивали по количеству апоптотических клеток методом проточной цитофлуориметрии с помощью набора ANNEXIN V-FITC — PI (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя. Апоптотические клетки определялись за счет высокоаффинного связывания аннексина V, меченного FITC, с фосфолипидом фосфатидилсерин, который на ранней стадии апоптоза перемещается на внешний слой мембраны клетки. Клетки, осторожно ресуспендируя, помещали в охлажденный при 4 °C связывающий буфер на 100 $\mu\text{л}$ буфера в каждой пробе и вносили по 5 $\mu\text{л}$ йодида пропидия и 1 $\mu\text{л}$ аннексина V-FITC, инкубировали в течение 15 мин при 4 °C, затем добавляли в каждую пробу по 400 $\mu\text{л}$ связывающего буфера, ресуспендировали и оценивали количество поврежденных клеток на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, США).

Для визуализации клеточных структур культуры фиксировали этанолом и окрашивали гематоксилином и эозином. Мониторинг клеточных культур и оценку динамики роста проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа BS-7000 («BestScope», КНР).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 8.0. Полученные данные не соответствовали закону нормального распределения, что позволили использовать для сравнения зависимых групп непараметрический критерий Вилкоксона. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости (p) < 0,05. Данные представляли в виде медианы (25%÷75% процентиля).

Первичные культуры адгезивных клеток ММСК костного мозга характеризовались морфологической гетерогенностью. К 3-5 суткам культивирования в первичных культурах наблюдались значительное количество прикрепленных округлых неделящихся клеток, наряду с отдельными колониями веретеновидных

фибробластоподобных клеток, которые в последующем покрывали всю поверхность культурального пластика клеток (рис. 1А).

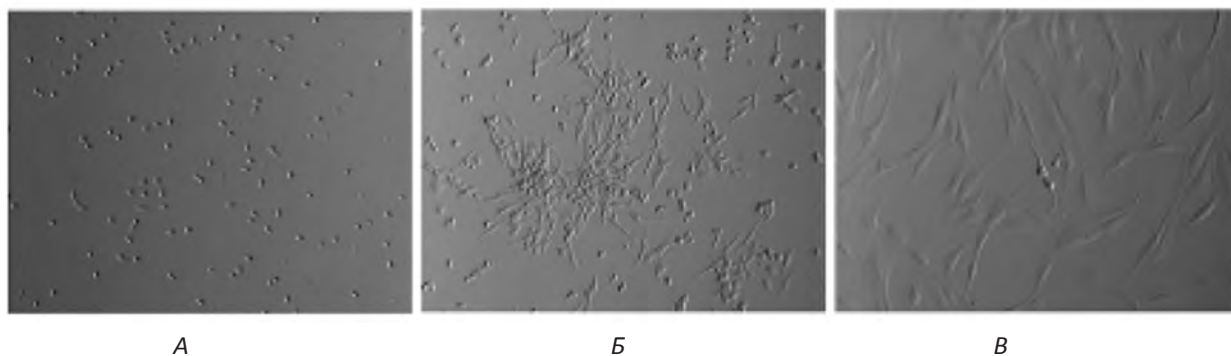


Рисунок 1 –Морфология культур ММСК костного мозга различного пассажа:

А – первичная культура, 3 день культивирования; Б – первый пассаж, 3 день культивирования;

В – 2 пассаж, 8 день культивирования (световая микроскопия, ув. 20х)

Начиная с первого пассажа наблюдалась морфологическая гомогенность культур (рис. 1Б и 1В). Клетки характеризовались веретеновидной фибробластоподобной морфологией с более или менее неравномерной по плотности цитоплазмой, хорошо заметным ядром. Такие клетки активно пролиферируют и перекрывают друг друга цитоплазмой. Установлено, что первичная культура ММСК костного мозга достигала 90% конфлюэнтности к 30-м суткам.

Жизнеспособность клеток, определяемая методом проточной цитометрии, колебалась от 92% до 98% и составляла 96% (92%÷98%).

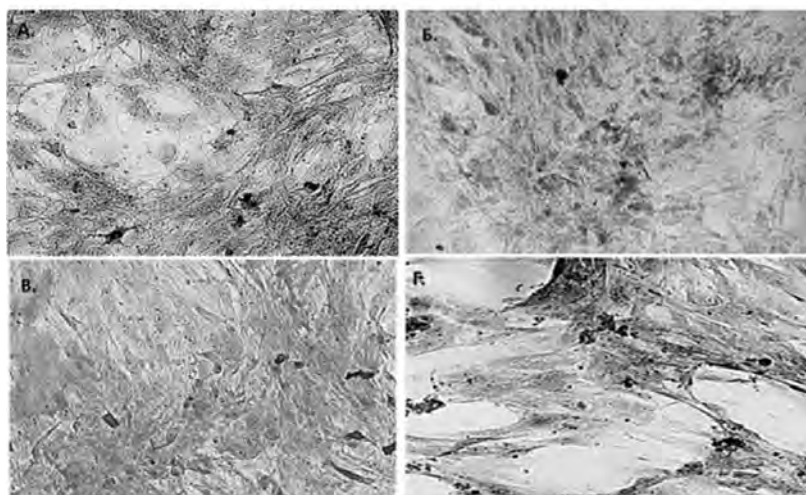


Рисунок 2 – Морфология ММСК костного мозга 2 пассажа на 5 день культивирования в стандартных условиях в присутствии различных концентраций глюкозы: А – интактные ММСК; Б – при добавлении 5мМ глюкозы;

В – 10мМ глюкозы; Г – 25мМ глюкозы (окраска гематоксилин-эозином, световая микроскопия, ув. 20х)

Для оценки влияния глюкозы на морфологию и пролиферацию ММСК к культурам 2 пассажа ($2,7 \times 10^5$ клеток/лунку 24 – луночного планшета) добавляли исследуемое вещество в конечных концентрациях 5мМ, 10мМ и 25мМ. На 5 день культивирования в присутствии глюкозы не визуализировалось изменений в морфологии клеточных культур. Жизнеспособность ММСК при различных концентрациях глюкозы статистически значимо не отличалась от аналогичного показателя в интактных культурах клеток (без добавления глюкозы, 96% (91%÷97%).

Вне зависимости от концентраций глюкозы 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:

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

Частота удвоения популяций для интактных культур ММСК костного мозга составляла 3,4 (3,1÷3,7) усл. ед. и статистически значимо не отличалась от аналогичного показателя в культурах, содержащих 25 мМ (2,7 (2,4÷ 3,0) усл. ед), 10 мМ (3,1 (2,8 ÷3,4) усл. ед.) и 5 мМ (3,3 (3,0÷3,6) усл. ед.) глюкозы.

При добавлении глюкозы в концентрациях от 5 мМ до 25 мМ к ММСК костного мозга не наблюдалось статистически значимых изменений жизнеспособности, морфологии и пролиферативного потенциала исследуемых клеточных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зафранская, М. М. Мезенхимальные стволовые клетки как стратегия лечения рассеянного склероза: актуальные проблемы и перспективы/М.М. Зафранская, Д.Б. Нижегородова//Медицинская иммунология, 2017. – № 6. – С. 683-704.
2. Пыко, И. В. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга: свойства, функции, возможность использования в регенеративной и восстановительной терапии/И.В. Пыко, С.В. Корень, З.Б. Квачева, А.С. Федулов// Медицинский журнал, 2007. – №4. – С.18-22.
3. Najmaldin, Saki. Adverse Effect of High Glucose Concentration on Stem Cell Therapy/ International Journal Hematology Oncology Stem Cell Research, 2013. – № 7. – P.34–40.
4. Зафранская, М. М. Морфология, кинетика роста и фенотип мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека / М.М. Зафранская, Н.В. Ламовская, Д.Б. Нижегородова, М.Ю. Юркевич, С.С. Багатка, С.Ю. Мечковский, Г.И. Иванчик, Г.Я. Хулуп//Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2010. – № 4 – С. 86-93.

РАСЧЁТ ГОДОВОЙ ЭФФЕКТИВНОЙ ДОЗЫ ВНУТРЕННЕГО ОБЛУЧЕНИЯ НАСЕЛЕНИЯ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ УПОТРЕБЛЕНИЕМ В ПИЩУ МЁДА, ПРОИЗВЕДЁННОГО НА ТЕРРИТОРИИ ПОЛЕССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО РАДИАЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАПОВЕДНИКА

CALCULATION OF THE ANNUAL EFFECTIVE DOSE OF THE INTERNAL IRRADIATION OF THE POPULATION DUE TO CONSUMPTION OF HONEY PRODUCED IN THE TERRITORY OF THE POLESKI STATE RADIOECOLOGICAL RESERVE

**В. А. Кравченко¹, А. Н. Батян¹, В. Н. Калинин², К. С. Нагула¹, Е. Н. Хрусталёва¹
V. Kravchenko¹, A. Batyan¹, V. Kalinin², K. Nagula¹, E. Khrustalyova¹**

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь

²Полесский государственный радиационно-экологический заповедник
Гомельская область, Республика Беларусь
kravchenko.v.anat@gmail.com

¹Belarusian State University A. D. Sakharov BSU
Minsk, Republic of Belarus

²Poleski state radioecological reserve
Gomel region, Republic of Belarus

В 2017 и 2019 годах проведены исследования мёда, полученного на пасеке расположенной в населённом пункте Бабчин. Данный населённый пункт находится на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника (Белорусская часть зоны отчуждения ЧАЭС). Удельная активность почвы по Cs-137 варьировала от 780 Бк/кг до 2044 Бк/кг, а по Sr-90 от 78 до 108 Бк/кг.

Из изученных мёдов в 2017 году наиболее загрязнённым оказался акациевый – 168 Бк/кг, а наименее загрязнённый – рапсовый (46 Бк/кг). Данный факт указывает на значительную роль в миграции радиоцезия-137 в мёд. Кроме этого значение имеют видовые особенности растений-медоносов, о чём свидетельствует превышение коэффициентов накопления по Cs-137 акациевого мёда над гречишным в 1,9 раза.

Годовая эффективная доза внутреннего облучения населения мёдом, произведённым в 2017 году на территории населённого пункта Бабчин, не превышала 0,02 мЗв, а в 2019 году – 0,0016 мЗв. Указанные различия, вероятно, обусловлены неодинаковыми погодными условиями, биологическими особенностями пчелиных семей, а также различием в видовом составе растений-медоносов.

In 2017 and 2019, studies of honey obtained in an apiary located in the village of Babchin were conducted. This settlement is located on the territory of the Polesky State Radiation-Ecological Reserve (Belarusian part of the Chernobyl Exclusion Zone). The specific soil activity for Cs-137 ranged from 780 Bq/kg to 2044 Bq/kg, and for Sr-90 from 78 to 108 Bq/kg.