

УДК 576.57.085.602

О. Маслова, асп., Г. Островська, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОДИФІКОВАНІ УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ ЯК СПОСІБ ВПЛИВУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ КЛІТИН ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ

Дослідження присвячено стандартизації процедури культивування мезенхімальних клітин пуповини людини. Описано ефекти збагаченої тромбоцитами плазми та синтетичних інгібіторів протеїнкіназ на культуру мезенхімальних клітин. Показано, що збагачена тромбоцитами плазма може бути заміником ембріональної телячої сироватки, а ефекти синтетичних інгібіторів протеїнкіназ на культуру клітин залежать від їх хімічної структури і концентрації та від періоду росту культури.

Ключові слова: пуповина, культура клітин, мезенхімальні клітини, збагачена тромбоцитами плазма, інгібітори протеїнкіназ.

Вступ. Морфофункціональні характеристики мезенхімальних стовбурових клітин (або мультипотентних стромальних клітин) є питанням, що активно та різнобічно вивчається у провідних лабораторіях світу. Адже саме МСК є на сьогодні найбільш перспективним джерелом клітинного матеріалу для регенеративної медицини [1, 2]. Одним з найбільш оптимальних джерел МСК вважається сполучна тканина пуповини. Клітини отримані з цього матеріалу є онтогенетично ранньою популяцією та займають проміжне місце між мультипотентними та плюрипотентними клітинами. Важливими факторами на користь пуповини також є відсутність етичних протиріч, доступність, адже пуповина вважається утильним матеріалом, відносна простота ізолювання мезенхімальних клітин [1-3].

Однак різноманіття патологій, що можуть бути скориговані за допомогою цих клітин, приводить до потреби детальної характеристики та ретельної підготовки матеріалу. Проблема адекватної підготовки МСК до введення пацієнтам гостро стоїть у всьому світі. Задля уніфікації вимог до умов роботи з клітинами було створено низку міжнародних стандартів, найбільш популярним з яких є фармацевтичний стандарт GMP (good manufacturing practice), що для роботи з клітинами і тканинами був модифікований у стандарт GTP (good tissue practice) [1-3]. У даній роботі розглядаються можливості регулювання властивостей МСК у культурі лише з науково-дослідною метою, проте, базуючись саме на таких дослідженнях, у майбутньому можуть бути розроблені чіткі вказівки щодо підготовки МСК для застосування у конкретних випадках.

Культивування МСК пов'язане з рядом методологічних труднощів. При культивуванні МСК з усіх відомих джерел гостро постає питання підбору оптимального поживного додатка до культурального середовища, що забезпечував би тривале збереження дедиференційованого стану клітин і не спричиняв би малигізації культури [1-11].

Відомо, що важливу роль у проліферації, самовідновленні, диференціюванні й здатності до хоумінгу МСК відіграє активація рецепторів тирозин-кіназного типу, що призначені для зв'язування з ключовими факторами росту (PDGF, EGF, IGF-1 тощо) [4-12]. Збагачена тромбоцитами плазма (ЗБТП) містить близько тисячі ростових факторів, основними з яких є: PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\alpha\beta$, PDGF $\beta\beta$, TGF β 1 та TGF β 2, IGF-1, VEGF, PDAF, FGF, TSP, які виступають у ролі стимуляторів проліферації та регуляторів диференціювання МСК та здатні регулювати формування позаклітинного матриксу [4-9,11]. Похідні малеїміду здатні взаємодіяти з АТФ-зв'язуючим сайтом тирозин-кіназних рецепторів та, таким чином, впливати на життєдіяльність МСК. Недостатньо вивчено ступінь селективності таких інгібіторів, тому важливим є аналіз їх впливів на характеристики клітин. Інгібітори протеїнкіназ вважаються потужними сучасними

протираковими препаратами. Похідні малеїміду (MI-1) та дигідропіролу (Д-1) є перспективними кандидатами для використання у терапії. Показано, що ці речовини мають виражений цитостатичний вплив на культури малигізованих клітин (лінія раку товстої кишки та інші) і практично не впливають негативно на нормальні клітини (фібробласти, ендотеліальні та інші) [12-14].

Культивування МСК зі строми пуповини та інших джерел є необхідним етапом нарощення кількості клітин при терапевтичному застосуванні МСК. З метою стандартизації та оптимізації усього процесу культивування до потреби потенційного застосування, ведуться пошуки оптимального джерела ростових факторів не ксеногенного походження (що є вкрай важливо у зв'язку з потенційною небезпекою занесення інфекційних агентів, або інших небезпечних факторів, що не підлягають ефективності детекції.), яке забезпечувало би збереження характеристик, що властиві культурі, вирощеній у присутності стандартного додатку – ЕТС. Існують роботи, що аналізують вплив різних (5-20%) концентрацій ЗБТП на морфофункціональні характеристики культур клітин. Базуючись на цих [4-11] та даних власних попередніх досліджень [16] для роботи було обрано концентрацію 10%.

Метою роботи було вивчення змін морфофункціональних особливостей мезенхімальних клітин пуповини людини за умов культивування у присутності різних стимулюючих (наприкладі ЗБТП) та інгібуючих (наприкладі похідних малеїміду та дигідропіролу) проліферацію додатків до поживного середовища.

Матеріали та методи. Експеримент проведений на культурах МСК пуповини людини. Пуповини за інформованою згодою породілі були надані Київським пологовим будинком №5. Клітини були ізовані за власною комбінованою (механічна та ферментативна) методикою – патент на корисну модель МПК 2012.01 C12N5/00, №74171 від 25.10.2012 [15]. Культивування проводилось у пластикових флаконах (РАА, Австрія) 75 см² та 25 см². Для оцінки стану культур клітин застосовувався інвертований мікроскоп Leica DMIL. Використовувалося поживне середовище DMEM (Sigma) з низьким вмістом глюкози. Збагачена тромбоцитами плазма отримувалась від здорових донорів за двоетапною методикою центрифугування та згідно рекомендацій для використання у культивуванні клітин [16]. Стандартне джерело ростових факторів – ембріональна теляча сироватка (ЕТС) (виробник: РАА Laboratories) використовувалась у концентрації 10%. Враховуючи неоднозначність літературних даних, що пропонують різні концентрації ЗБТП, було проведено попереднє тестування концентрацій ЗБТП, отриманих з пуповинної крові (аутологічна) та від дорослих донорів (алогенна) і обрано робочу концентрацію 10% [4-11,16]. Було проаналізовано 30 зразків культур МСК 2-го пасажу, що, у залежності від використаного додатку до середовища, були роз-

ділені на 3 групи по 10 зразків: ЕТС, ЗБТП (аутологічна) та ЗБТП (алогенна). За культурами спостерігали протягом 21 дня, до проведення наступного етапу пасажування. Середовище замінювали двічі на тиждень. Два зразки, що вирощувались із додаванням алогенної ЗБТП вибули з наступних етапів порівняння, у зв'язку з вираженим цитотоксичним ефектом, що проявився на третю добу. Аутологічну ЗБТП не вдалось отримати з 3 зразків кордової крові, у зв'язку з гемолізом. Один зі зразків культури, що були вирощені у присутності ЕТС вибув з експерименту через грибкову контамінацію. Однорідність культури оцінювали за ступенем морфологічної подібності одна до одної клітин у культурі, зокрема за такими показниками – фібробластоподібна форма, світла цитоплазма, моношар без атипичних утворень тощо. Для перевірки збереження властивостей МСК було обрано класичні позитивні маркери МСК: CD105, CD90, CD73. Аналіз проводився згідно класичних протоколів. Клітини вміщували в епендорф у вигляді суспензії ($1 - 5 \times 10^6$ кл/мл) у крижаному PBS з додаванням 1 % азиду натрію. Додавали 0,1 – 10 мкг/мл первинних мічених антитіл, розчинених у 3 % BSA/PBS та інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Потім клітини відмивали тричі, центрифугуючи на 400 g протягом 5 хв та ресуспендували у 500 мкл крижаного PBS. Після цього етапу матеріал аналізувався у проточному цитометрі. Як мітка використовувався FITC. Були виконані стандартні контрольні виміри. Методика була поставлена у відділі клітинних та тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМНУ. Визначення здатності до хондрогенезу здійснювалось цитохімічно, шляхом забарвлення альціановим синім. Синтетичні інгібітори протеїнкіназ – похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-

пірол-2,5-діон (M1) та похідне дигідропіролу 1,4-заміщений 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-он (D1) були синтезовані у ХіміоБіоЦентрі КНУ імені Тараса Шевченка. Для оцінки морфологічних характеристик культури під впливом вищевказаних речовин, клітини висівали з розрахунку 1000 на лунку у 6-лункові планшети з додаванням спадаючих концентрацій речовин M1 та "D-1" (титр від 10^{-3} до 10^{-9} мкг/мл). Паралельно ставились два варіанти: одночасне з розсівом додавання інгібіторів протеїнкіназ та додавання речовин на наступну добу (після прикріплення клітин). Спостереження проводили протягом 7 діб, морфологічні характеристики клітин аналізували на 3-й та 7-й день після висіву клітин.

Результати та їх обговорення. Нами показано, що при культивуванні як у присутності ЕТС, так і у присутності обох варіантів ЗБТП (алогенного та аутологічного) культура мала наступні морфологічні характеристики: виражений клональний ріст, клітини 25-50 мкм у довжину, фібробластоподібні, з одним або кількома овальними ядрами та кількома ядерцями, формують моношар, зустрічаються скупчення клітин (рис. 1). Клітини експресують поверхневі маркери МСК CD105, CD90, CD73 та здатні до перетворення на хондроти. Досліджувані культури були доведені до 6 пасажу і було показано, що зразки, які культивувались у присутності ЗБТП (алогенної та аутологічної) зберігали морфологічні ознаки МСК [17,18] довше – до 5-6 пасажу: більша частина культури була представлена веретеноподібними клітинами зі світлою цитоплазмою. У присутності ЕТС на 5-6 пасажі вже починали переважати крупні багатоядерні клітини. У деяких клітинах з'являлись темні гранули, а у деяких – прозорі вакуолі. Це може свідчити про початок процесу старіння культури, втрату мультипотентності клітин та розвиток апоптозу.

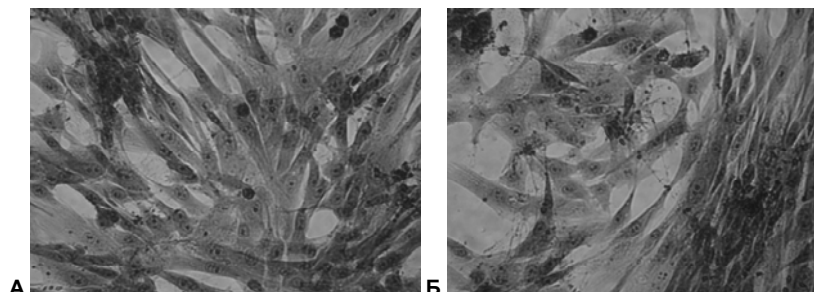


Рис. 1. Порівняння морфологічних характеристик мезенхімальних клітин пуповини людини, що були культивовані у присутності ЕТС (а) та ЗБТП (б), 2 пасаж, зб. $\times 100$, забарвлення гематоксином

Отже, основну мету вибору такого додатку – уникнення елементів ксеногенного походження у середовищі без втрати клітинною культурою морфологічних характеристик можна вважати досягнутою: дане дослідження демонструє ефективність заміни ЕТС на ЗБТП при культивуванні МСК з пуповини людини.

На сьогодні у світі проведено ряд досліджень впливу інгібіторів протеїнкіназ на морфологічні характеристики та проліферативний потенціал культур клітин ссавців різних типів (нормальних та трансформованих). Однак, клітини матриксу пуповини, як і інші типи клітин зі стовбуровими властивостями, для таких досліджень не використовувались. Біологічні ефекти інгібіторів протеїнкіназ M1-1 та D-1 також є ще недостатньо дослідженими, тому відомості про їхні впливи на культуру МСК є особливо цінними.

Для оцінки впливу різних концентрацій M1-1 та D-1 на морфологічні ознаки культури, було обрано культуру мезенхімальних клітин 1-го пасажу у різні періоди часу після висіву (на 3-й та 7-й дні), які різняться за ступенем

прикріплення клітин та їх морфологічними ознаками. На 3-й день після висіву клітин у середовище з додаванням M1-1 та D-1 у концентраціях від 10^{-3} до 10^{-9} моль/л (М) у контрольних культурах були присутні видовжені клітини з рівними краями, що щільно прилягали одна до одної, зі світлою цитоплазмою, досить великим ядром з кількома ядерцями (рис. 2). Середовище навколо культури залишалось прозорим. Культура була майже однорідною, деякі клітини знаходились на стадії поділу. Трипановий синій не забарвив жодної клітини. Ефекти M1-1: Культура, що була висіяна з додаванням M1-1 у концентрації 10^{-3} М містила багато мертвих клітин, та клітин округлих, неправильної форми, з зернистою цитоплазмою. У культурі, що вирощувалась при концентрації M1-1 10^{-4} М зустрічались поодинокі мертві клітини, культура була неоднорідною за морфологічними ознаками. При додаванні M1-1 у концентраціях 10^{-5} – 10^{-7} М культури були схожими за морфологічними ознаками на контрольний зразок. При концентраціях 10^{-8} – 10^{-9} М культури знаходились у хорошому стані, були морфо-

логічно подібними до контрольного зразка, подекуди навіть більш однорідними та з більшою кількістю клітин, що діляться. Ефекти Д-1: стан культури, що була висіяна з додаванням речовини Д-1 у концентрації 10^{-3} М, свідчив про значний цитотоксичний вплив даної речовини, вона практично не містила живих клітин. У культурі, що вирощувалась при концентрації Д-1 10^{-4} М спостерігалась велика кількість мертвих та не прикріплених клітин, зустрічались клітини різної форми, багато з них містили темну зернистість. При додаванні Д-1 у концентраціях 10^{-5} - 10^{-7} М культури наближались за морфологічними ознаками до контрольної, але були все ж менш однорідними. При концентраціях 10^{-8} - 10^{-9} М культури відповідали контрольній за основними характеристиками.

Отже, на 3-й день культивування МСК при концентраціях 10^{-3} - 10^{-4} М ефекти Д1 на життєздатність і морфологічні ознаки клітин є більш вираженими, ніж ефекти МІ-1.

На 7-й день після висіву клітин у середовище з додаванням МІ-1 та Д-1 у концентраціях від 10^{-3} до 10^{-8} М спостерігалась наступна картина. У контрольних зразках переважали видовжені клітини, що щільно прилягали одна до одної. Клітини мали світлу цитоплазму, середовище навколо культури містило невеликі частинки детриту, допустимі для культури такого віку та ступеня конфлюентності. Культура була практично однорідною за морфологічними характеристиками. У деяких ділянках спостерігалось нашарування клітин та їх клональний ріст. Трипановий синій забарвив одиничні клітини (0,5%). Ефекти МІ-1: При додаванні МІ-1 у найбільшій концентрації (10^{-3} М) культура була повністю мертвою. У культурі, що росла за умов додавання МІ-1 у концен-

трації 10^{-4} зустрічались поодинокі мертві клітини, культура була морфологічно неоднорідною, були присутні клітини різного розміру, деякі з них мали великі ядра та відростки. При додаванні МІ-1 у концентраціях 10^{-5} - 10^{-7} М культура була схожою за ознаками на контрольний зразок, але у ній спостерігалось менше нашарувань клітин (рис. 3). МІ-1 у концентраціях 10^{-8} - 10^{-9} М практично не впливав на стан культури, за морфологічними характеристиками клітини відповідали контрольним зразкам та були навіть більш однорідними. Ефекти речовини Д-1: Культура, що була висіяна з додаванням похідного дигідропіролу Д-1 у концентрації 10^{-3} М містила мертві клітини та велику кількість детриту. При додаванні Д-1 у концентрації 10^{-4} М спостерігались мертві клітини, проте зустрічались і живі, фібробластоподібні. За умов додавання Д-1 у концентраціях 10^{-5} - 10^{-7} М спостерігалась культура середньої однорідності, з клітинами дещо більшого (порівняно з контролем) розміру, з великими ядрами (рис. 4), інколи багатоядерні. При культивуванні у присутності Д-1 у концентрації 10^{-8} - 10^{-9} М клітини перебували у хорошому стані, культура була однорідна та чиста. На 3й день після додавання речовин МІ-1 та Д-1 у середовище з попередньо прикріпленими до субстрату клітинами, навіть у концентрації 10^{-5} - 10^{-4} М культура за морфологічними показниками наближалась до контрольної: клітини характерної фібробластоподібної форми, з чітким ядром, у деяких зразках сформувались колонії.

Таким чином, ефекти речовин МІ-1 та Д-1 після прикріплення клітин, навіть при вищих концентраціях, є менш цитотоксичними, ніж до їх прикріплення

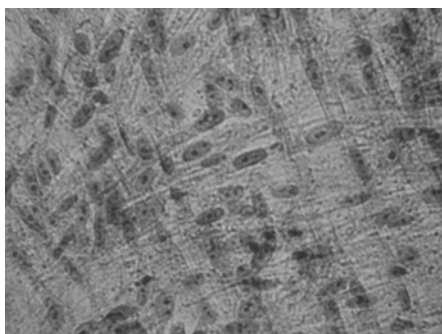


Рис. 2. Контрольна культура мезенхімальних клітин матриксу пуповини 1-го пасажу, забарвлення гематоксилином, зб. $\times 100$

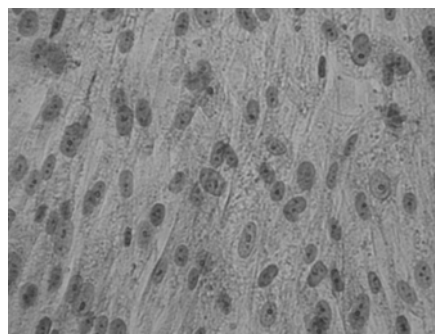


Рис. 3. Культура 1-го пасажу, культивування у присутності МІ-1 10^{-6} моль/л, забарвлення гематоксилином, зб. $\times 100$

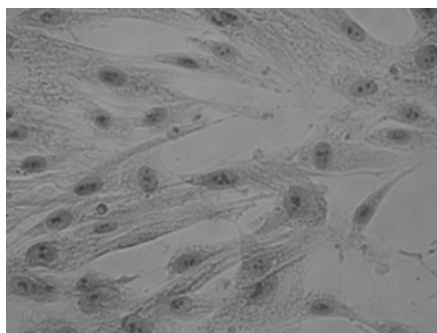


Рис. 4. Культура 1-го пасажу, культивування у присутності речовини Д-1 10^{-6} моль/л, забарвлення гематоксилином, зб. $\times 100$

При додаванні речовин на 2-й день культивування навіть в одразу більшій концентрації культури проявляли більшу стійкість, були більш морфологічно однорідними. Також помітно, що спочатку від більших концент-

рацій клітини гинуть, але ті, що виживають – продовжують нормальну життєдіяльність. Можливо, саме у цьому і проявляється принцип селекції певної популяції клітин. Д-1 спочатку провокує масивну загибель клітин,

але при подальшому підтриманні культури, у зразках з невисокими концентраціями клітини відрізнялись від контролю у кращий бік. Для отримання обґрунтованих висновків планується провести додаткові дослідження, але не виключається можливість селекції певної особливо стійкої до дії інгібіторів протеїнази популяції, що може мати модифіковані властивості, у тому числі – проявляти ознаки трансформованих клітин.

Хоча вважається, що мезенхімальні клітини з матриксу пуповини володіють найменшою туморогенністю, проте вплив застосованих у дослідженні інгібіторів протеїнази на ці клітини є нелінійним. Це може мати наступне пояснення: мезенхімальні клітини, хоч і вважаються гомогенною культурою, найвірогідніше, мають субпопуляції, що дещо відрізняються за морфофункціональними характеристиками. Так, частина клітин може мати надвисокий проліферативний потенціал, а частина – перебувати у стані спокою [1-3]. Можливо, ці функціональні стани впливають і на здатність до диференціювання: Клітини сполучної тканини пуповини прийнято називати плюри/мультипотентними, можливо, у популяції присутні і мультипотентні, і плюрипотентні клітини, а також частина більш диференційованих міофібробластів. Відповідно і потенційний терапевтичний вплив культури та ймовірність виникнення побічних ефектів можуть залежати саме від співвідношення різних субпопуляцій у конкретному зразку клітинного матеріалу. МСК можуть використовуватись як вектори для перенесення субстанцій, у тому числі – з метою боротьби з пухлинами, адже ці клітини володіють унікальною здатністю рухатись у напрямку новоутворень в організмі. Проте існують повідомлення, що вказують на потенційну схильність МСК до підвищення малігнізації. З метою зменшення таких негативних ефектів, МСК можна використовувати паралельно з цитостатичними препаратами, до яких і належать синтетичні інгібітори протеїнази. Тому винятково важливим є багатогранне вивчення впливу таких речовин на МСК. Ці дослідження є абсолютно новими для усієї світової спільноти, тому у даній роботі розглядається лише пілотна частина – вплив синтетичних інгібіторів протеїнази на проліферативну здатність та морфологічні характеристики МСК, отриманих зі сполучної тканини пуповини людини. Отримані дані дозволяють спланувати подальші цитологічні, біохімічні та молекулярно-біологічні дослідження. Таким чином використання MI-1 та речовини D-1 може стати корисним як для більш детального вивчення ефектів цих речовин на різні типи клітин, так і для наближення до розуміння природи МСК та спроби селекції найбільш безпечної субпопуляції клітин.

Висновки. В дослідженні встановлено позитивний вплив збагаченої тромбоцитами плазми (у концентрації 10%) як додатку до середовища культивування на морфо-функціональний стан клітин матриксу пуповини. Показано, що такий додаток, джерело широкого спектру ростових факторів, може бути оптимальним заміником ксеногенного додатку – ембріональної телячої сироватки. Дослідження впливу синтетичних інгібіторів тирозинових протеїназ – речовин MI-1 та D-1 у різних концентраціях – на культури МСК на різних пасажах дозволяє припустити

існування в таких культурах популяцій клітин, що різняться за проліферативним та туморогенним потенціалом.

Список використаних джерел

1. Augello A. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niche / A. Augello, T. B. Kurth, C. De Bari // Eur. Cell Mater. – 2010. – Vol. 1, No. 20. – P. 121 – 133.
2. Bieback K. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy / K. Bieback, I. Brinkmann // World J. Stem. Cells. – 2010. – Vol. 2, No. 4. – P. 81 – 92.
3. Maslova O.O., Umbilical Cord Matrix Cells – Promising Instrument For Regenerative Medicine (Chapter 8) / Maslova O.O., Deryabina O.G., and Kordium V.A. // Biomaterials for Stem Cell Therapy State of the Art and Vision for the Future ISBN 978-1-4665-7639-1. – January 2013. – P.212-217.
4. Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue / A. Kocaoemer, S. Kern, H. Klüter, K. Bieback // Stem. Cells. – 2007. – Vol. 25, No. 5. – P. 1270 – 1278.
5. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? / L. Johansson, J. Klinth, O. Holmqvist, S. Ohlson // Journal Cytotechnology. – 2003. – Vol. 42, No. 2. – P. 67 – 74.
6. PRP: A Possibility in Regenerative Therapy / J. P. M. Issa, R. Tiossi, A. S. da Silva Mello et al. // Int. J. Morphol. – 2007. – Vol. 25. – P. 587 – 590.
7. Peerani R. Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell-niche engineering / R. Peerani, P. W. Zandstra // J. Clin. Invest. – 2010. – Vol. 1. – P. 60 – 70.
8. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells / E. Lucarelli, A. Beccheroni, D. Donati et al. // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24. – P. 95 – 100.
9. Influence of Platelet-Rich Plasma on Osteogenic differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Ectopic Bone Formation in Calcium Phosphate Ceramics / P. Kasten, J. Vogel, R. Luginbühl et al. // Cells Tissues Organs. – 2006. – Vol. 183. – P. 68 – 79.
10. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC / R. Hass, C. Kasper, S. Bohm, R. Jacobs // Cell Commun. Signal. – 2011. – Vol. 14. – P. 9 – 12.
11. Andrade M. G. S. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties / M. G. S. Andrade, C. J. de Freitas Brandão // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. – 2008. – Vol. 105. – P. 5 – 12.
12. Dubinina G.G. Antiproliferative activity of the new derivatives of 1-(4-R-benzyl)-3-R1-4-(R2-phenylamino)-1<-pyrrole-2,5-dione / Dubinina GG, Golovach SM, Kozlovsky VO, Tolmachov AO, Volovenko YuM // Journal Organichnoi ta farmacevtichnoi khimii (Ukraine) – 2007. – Vol. 5. – P. 39-49.
13. Lynchac O. V. Morpho-functional state of the organs of gastrointestinal tract under the maleimide derivate action during one month / Lynchac O. V., Charchuk I. V., Karpezo N. O., Ostrovska G. V., Rybalchenko V. K. // Modern Problems of Toxicology – 2011. – N 1-2. – P. 52 – 55.
14. Garmanchuk L. V. MI1 – derivative of maleimide inhibits cell cycle progression in tumor cells of epithelial origin / Garmanchuk L. V., Denis E. O., Nikulina V. V., Dzhus O. I., Skachkova O. V., Ribalchenko V. K., Ostapchenko L. I. // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29(1). – P. 70-74.
15. Дєрябіна О.Г. Спосіб культивування мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих з пуповини людини №51214 Від 12.07.2010 МПК C12N5/00 / Дєрябіна О.Г., Маслова О.О., Сухорада О.М., Кордюм В.А.
16. Маслова О.О. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин з матриксу пуповини людини №74171 Від 25.10.2012 МПК C12N5/00 / Маслова О.О., Кордюм В.А., Шувалова Н.С., Дєрябіна О.Г., Сухорада О.М.
17. O.M. Tong C. K. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method / C. K. Tong, S. Vellasey, B. C. Tan // Cell Biology International. – 2011. – Vol. 35. – P. 221 – 226.
18. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, No. 4. – P. 315 – 317.

Надійшла до редколегії 25.12.13

О. Маслова, асп., Г. Островская, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАК СПОСОБ ВЛИЯНИЯ НА MORFOFUNKTIONAL'NYE SVOYSTVA MEZENHIMAL'NYKH KLETOK PUPOVINY CHELOVEKA

Исследование посвящено стандартизации процедуры культивирования мезенхимальных клеток из пуповины человека. Описаны эффекты обогащенной тромбоцитами плазмы и синтетических ингибиторов протеинкиназ на культуру мезенхимальных клеток. Показано, что обогащенная тромбоцитами плазма может заменить эмбриональную телячью сыворотку, а эффекты синтетических ингибиторов протеинкиназ на культуру клеток зависят от их химической структуры и концентрации и от периода роста культуры.

Ключевые слова: пуповина, культура клеток, мезенхимальные клетки, обогащенная тромбоцитами плазма, ингибиторы протеинкиназы.

O. Maslova, PhD stud., G. Ostrovska, Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

MODIFIED CULTURE CONDITIONS AS AN INFLUENCE ON MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL CELLS

Research is devoted to standardization of procedure of culturing mesenchymal cells from human umbilical cords. The effects of platelet-rich plasma and synthetic protein kinase inhibitors on the culture of mesenchymal cells are described. It is shown that platelet-rich plasma may be a substitute for fetal calf serum and that effects of synthetic protein kinase inhibitors on cell culture depend on their chemical structure and concentration and on the period of culture growth.

Key words: umbilical cord, cell culture, mesenchymal cells, platelet rich plasma, protein kinase inhibitors.

УДК 581.557:579.22

Ю. Кондратюк, канд. біол. наук, П. Маменко, канд. біол. наук, С. Коць, д-р біол. наук
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

ВПЛИВ РІЗНИХ ДОЗ МІНЕРАЛЬНОГО АЗОТУ НА ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ БІЛКА КОРЕНІВ ТА БУЛЬБОЧОК СОЇ, ІНОКУЛЬОВАНОЇ ШТАМАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ІЗ КОНТРАСНИМИ СИМБІОТИЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Дослідити динаміку змін загального вмісту білка коренів та бульбочок сої за інокуляції контрастними за симбіотичними характеристиками штамми *Bradyrhizobium japonicum* в умовах різного забезпечення мінеральним азотом. Насіння сої інокулювали активним та неактивним штамми ризобій. Рослини вирощували в умовах вегетаційного досліду. Для одержання білкових екстрактів корені та бульбочки відбирали у фази бутонізації, початку цвітіння та масового цвітіння рослин. Кількісний вміст сумарного білка в зразках визначали за методом Бредфорда. Показано відмінності у кількісному вмісті загального білка в коренях і бульбочках сої, інокульованої активним і неактивним штамми *B. japonicum*, залежно від фази росту рослин та дози внесення мінерального азоту. Висунуто припущення, що виявлені зміни вмісту білка пов'язані із процесами формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу.

Ключові слова: азотфіксація, ризобії, соя, симбіотичні системи, білки.

Вступ. Азот є одним із самих важливих органогенних елементів, якого потребують усі живі істоти для забезпечення своєї життєдіяльності [1, 2]. Проте багато різних процесів призводять до зменшення біологічної доступності азоту. Мобільність нітрогену спричиняє його вилучення з екосистем гідрологічними або атмосферними шляхами (вилузування, денітрифікація, ін.) [3]. Відносний дефіцит зв'язаного азоту на поверхні Землі при практично невичерпному його запасі в атмосфері передбачає наявність певного етапу, що лімітує швидкість кругообігу даного елемента. Промисловий синтез аміаку з азоту і водню становить не більше 5 % фіксованого азоту нашої планети [4, 5, 6].

Альтернативним джерелом зв'язаного азоту є мінеральні добрива. Проте високі ціни на енергоносії для виробництва мінеральних азотних добрив перешкоджають їх широкому застосуванню у рослинництві. А у зв'язку із нинішньої глобальної фінансовою кризою це є мотивацією до пошуку інших способів забезпечення важливих сільськогосподарських культур необхідними кількостями цього елемента.

З іншого боку відомо, що нітрати можуть накопичуватися в ґрунті і забруднювати навколишнє середовище. Крім цього збільшення концентрації нітратів у продуктивних частинах рослин має токсичний вплив на людей і тварин: у живих організмах вони перетворюються в нітрити, спричиняючи отруєння, розвиток раку та інших захворювань [7].

Одним із можливих шляхів одержання азоту є його біологічна фіксація з повітря мікроорганізмами, що здатні зв'язувати молекулярний азот атмосфери і перетворювати його в сполуки, доступні рослинам [8].

Соя є одним з основних джерел жирних кислот і білків для харчування людини і тварин. Вона також широко використовується у непродовольчих цілях, наприклад, у виробництві промислової сировини, палива, ін. [9, 10]. Після кукурудзи, пшениці та рису соя займає четверте місце в світі за обсягами виробництва зерна і одне з перших за точки зору біологічної фіксації азоту [11]. Вона здатна фіксувати 155–198 кг/га азоту в рік, забезпечувати свої потреби в азоті на 65–80 %, а значну частину своїх резервів залишати у ґрунті. Тобто кращих культур для сівозміни [12, 13].

може бути джерелом екологічно чистої продукції: біологічна особливість фіксувати значні кількості атмосферного азоту у симбіозі з бульбочковими бактеріями дозволяє вирощувати її без застосування мінеральних добрив або при їх дуже мінімальних кількостях [14].

Проте між кількістю наявного в ґрунті біологічно доступного нітрогену та інтенсивністю процесу симбіотичної азотфіксації є пряма залежність [15, 16]. Відомо, що азотні сполуки впливають на бобово-ризобіальні комплекси на всіх етапах формування і функціонування симбіозу, починаючи з утворення ризосфери і бульбочок та закінчуючи процесом активної азотфіксації [9]. У той же час встановлено, що високі дози азоту можуть пригнічувати азотфіксацію [17, 18]. Однак на фоні оптимальних доз азотних добрив для деяких культур азотфіксація на 30–45 % була вищою, ніж без них. Відповідно при раціональному поєднанні застосування мінерального та симбіотрофного азоту зростає і загальний вміст білка в надземній біомасі та насінні [19]. Саме тому в даний час велика увага приділяється питанню оптимізації співвідношення мінерального і біологічного азоту для створення ефективного бобово-ризобіального симбіозу, для чого у першу чергу потрібно мати глибокі знання про перебіг біосинтетичних процесів у симбіотичних системах.

Незважаючи на значні досягнення у вивченні проблеми симбіотичної азотфіксації, питання про механізми її регуляції при застосуванні різних доз мінеральних азотних добрив, що вносяться у ґрунт, залишається відкритим. Тому результати досліджень контрастних модельних систем на основі рослин сої та штамів *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності можуть наближити нас до розуміння фізіологічних, біохімічних та молекулярних аспектів функціонування бобово-ризобіального симбіозу, а також можуть стати потенційним підґрунтям для корекції існуючих чи створення нових біотехнологічних прийомів підвищення врожайності важливих сільськогосподарських культур взагалі і сої зокрема.

Існує велика кількість даних про зміни вмісту білка у тих частинах рослин сої, які використовуються у сільсь-

© Кондратюк Ю., Маменко П., Коць С., 2014