

УДК 537.612:611.018.46

ВЛИЯНИЕ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.

В.Г.Лещенко, Е.М.Ермоленко, Ж.А.Ибрагимова, Т.С.Колесникова, Е.В.Ходосовская, С.И.Марчук, С.Е.Семерихина, М.А.Шеламова

Белорусский государственный медицинский университет, пр-т Дзержинского, 83, 220116 Минск, Беларусь;

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают уникальными свойствами: они не специализированы, способны к пролиферации, дифференцировке и асимметрическому делению, способствуют регенерации тканей, мигрируя к зоне повреждения. Поэтому с практической точки зрения очень важным является изучение влияния различных факторов на дифференцировку и пролиферацию стволовых клеток [1,2].

В данной работе исследовалось влияние слабого переменного магнитного поля частотой 50 Гц и индукцией 28 мкТл на пролиферацию и хондрогенную дифференцировку МСК, выделенных из жировой ткани. Источником магнитного поля служила специально изготовленная катушка Гельмгольца, диаметром 162 мм и высотой 80мм. Магнитная индукция измерялась по оси катушки с относительной погрешностью 5%, неоднородность поля по радиусу катушки составляла около 10%.

Для исследования влияния магнитного поля на хондрогенную дифференцировку МСК высевали в лунки 24-луночного планшета в полной питательной среде (ППС) и в дифференцировочной среде (ДС). В течение первых 3-х суток культивирования стволовые клетки подвергали воздействию магнитного поля по 30 минут, после чего продолжали их культивирование до 13 суток без воздействия магнитного поля. В этой серии экспериментов было сформировано 4 варианта культивирования МСК:

- 1- МСК на ППС, - контроль
- 2 - МСК на ППС + магнитное воздействие
- 3 - МСК на ДС - контроль
- 4 - МСК на ДС + магнитное воздействие.

Количественный анализ содержания МСК, дифференцировавшихся в хондрогенном направлении, проводили путем окрашивания сульфатированных протеогликанов красителем альциановый голубой и последующим измерением оптической плотности растворов на длине волны 630нм планшетным спектрофотометром StatFax.

По полученным данным рассчитывали индекс действия (ИД), принимая за 1 индекс действия контрольных вариантов. Были проведены измерения оптической плотности всех образцов на 6, 9 и 13-е сутки культивирования. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Табл.1. Действие магнитного поля на хондрогенную дифференцировку МСК.

Сроки культивирования	ППС (контроль) ИД	ППС+ магнит ИД	ДС (контроль) ИД	ДС+ магнит ИД
6 суток	1,0	0,93	1,0	0,82
9 суток	1,0	1,22	1,0	1,39*
13 суток	1,0	1,13	1,0	1,34*

Примечание: - * достоверность различий при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю

Как видно из представленных результатов, на 6-е сутки культивирования МСК под действием магнитного поля как в полной, так и в дифференцировочной среде произошло снижение индекса действия. На 9-е сутки культивирования под действием магнитного поля ИД достоверно увеличился в группе МСК, культивированных в дифференцировочной среде. На 13-е сутки культивирования наблюдалось снижение уровня действия магнитного поля на хондрогенную дифференцировку в культурах клеток, культивированных в условиях полной питательной среды и дифференцировочной среды, однако достоверно более значимое снижение произошло в культуре клеток, культивированных в ППС по сравнению с таковой в ДС.

Эти результаты были также подтверждены с помощью ПЦР-анализа генетических маркеров хондрогенной дифференцировки COL2A1, ACAN (Aggrecan), SOX9, проведенного для контрольных и экспериментальных образцов.

Таким образом, данные исследования показали, что под действием магнитного поля индукцией 28 мкТс, частотой 50 Гц в режиме воздействия по 30 мин. в течение 3-х дней происходит увеличение индукции хондрогенной дифференцировки МСК, наиболее выраженное на 9-е сутки культивирования. При дальнейшем культивировании МСК стимулирующее действие магнитного поля сохраняется.

Нами было исследовано также влияние магнитного поля на пролиферацию МСК, но в несколько другом временном режиме (по 90 минут воздействия полем в течение первых трех суток культивирования) в полной питательной среде. Было поставлено два варианта исследования:

1. МСК в полной питательной среде (ППС) – контроль;
2. МСК в ППС с воздействием магнитным полем $B_{эф} = 28$ мкТл по 90 минут в течение первых 3-х дней культивирования (опыт).

Для изучения влияния магнитного поля на пролиферацию клетки снимали с поверхности культурального пластика на 6, 9, 12, 14 сутки. Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с помощью камеры Горяева. Результаты представлены в табл.2.

Табл. 2. Сравнение пролиферации клеток в контроле и при воздействии магнитным полем 28 мкТл.

Образцы	Количество клеток (тыс /мл)			
	6-е сутки	9-е сутки	12-е сутки	14-е сутки
Контроль	45	57	85	65
$B = 28$ мкТл	47,5	40	50	40

Как видно из таблицы, скорость пролиферации клеток, подвергшихся воздействию магнитного поля, значительно снижается по сравнению с контрольными образцами, начиная с 9-х суток культивирования.

Возможность хондрогенеза оценивали с помощью ПЦР - анализа путем исследования клеток на появление экспрессии маркеров хондрогенной дифференцировки коллагена II, агрекана и SOX9.

Молекулярно-биологические исследования подтвердили наличие маркеров хондрогенеза в образцах, культивируемых в ППС без дифференцировочных факторов и подвергшихся воздействию магнитного поля.

Таким образом, воздействие переменным магнитным полем частотой 50 Гц и индукцией 28 мкТл на мезенхимальные стволовые клетки значительно снижает скорость их пролиферации и одновременно ведет к увеличению индукции их хондрогенной дифференцировки.

Литература:

1. Kern S, Eichler H, Stoeve J et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. STEM CELLS 2006; 24:1294–1301.
2. Lee RH, Kim B, Choi I et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. Cell Physiol Biochem 2004;14:311–324.

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.

Ермоленко Е.М., Ибрагимова Ж.А., Колесникова Т.С., Ходосовская Е.В., Марчук СИ., Семерихина С.Е., Лещенко В.Г.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, РБ.

В предыдущей работе [1] нами было отмечено, что магнитное поле может оказывать хондрогенное действие на мезенхимальные стволовые клетки (МСК) не только в дифференцировочной среде, но и полной питательной среде, без специальных биохимических добавок. В данной работе исследовалось влияние переменного магнитного поля на пролиферацию, жизнеспособность и возможность хондрогенеза МСК, без добавления биохимических факторов, влияющих на их хондрогенную дифференцировку.

На культуры МСК воздействовали переменным магнитным полем частотой 50 Гц, индукцией 28 мкТл и 182 мкТл в течение первых 3-х суток культивирования.

Были исследованы 4 группы образцов:

3. МСК в полной питательной среде (ППС) – контроль;

4. МСК в ППС с воздействием магнитным полем $B_{эф} = 28$ мкТл по 90 минут в течение первых 3-х дней культивирования;

3. МСК в ППС - контроль;

4. МСК в ППС с воздействием магнитным полем $B_{эф} = 182$ мкТл по 30 минут в течение первых 3-х дней культивирования;

Для изучения влияния магнитного поля на пролиферацию клетки снимали с поверхности культурального пластика на 6, 9, 12, 14 сутки. Жизнеспособность и пролиферацию оценивали микроскопическим методом с помощью камеры Горяева. Возможность хондрогенеза оценивали путем исследования клеток на появление экспрессии маркеров хондрогенной дифференцировки коллагена II, агрекана и SOX9.

Результаты сравнительного анализа пролиферации МСК контрольных образцов и образцов, подвергнувшихся действию магнитных полей индукцией $B_{эф} = 28$ мкТл и 182 мкТл, представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Сравнение пролиферации клеток при воздействии магнитным полем 28 мкТл.

Образцы	Количество клеток (тыс /мл)			
	6 сутки	9 сутки	12 сутки	14 сутки
Контроль	45	57	85	65
$B = 28$ мкТл	47,5	40	50	40

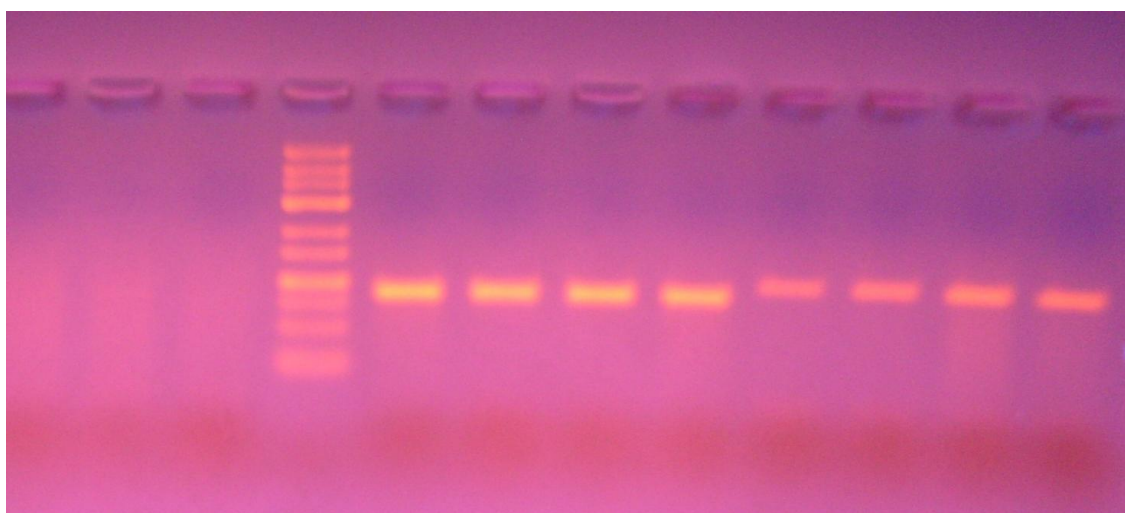
Таблица 2. Сравнение пролиферации клеток при воздействии магнитным полем 182 мкТл.

Образцы	Количество клеток (тыс /мл)			
	6 сутки	9 сутки	12 сутки	14 сутки
Контроль	100	110	130	150
B=182 мкТл	60	65	100	100

Как видно из таблиц, скорость пролиферации клеток, подвергшихся воздействию магнитного поля, значительно снижается начиная с 6-9 суток культивирования по сравнению с контрольными образцами. Причем, увеличение индукции магнитного поля с 28 до 182 мкТл оказывает более сильное угнетающее действие на пролиферацию экспериментальных образцов.

Для выявления хондрогенного действия магнитного поля на МСК, были проведены молекулярно-биологические исследования (ПЦР-анализ) образцов на наличие генетических маркеров дифференцировки (SOX9, Aggrecan), представленные на рис.1. Для положительного контроля использовали биоптаты хрящевой ткани.

Рисунок 1. - Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа экспрессии гена SOX9 и Aggrecan на 9-12 сутки культивирования.



1 2 3 4 5 6 7 8 9

1 дорожка- маркер ДНК(«Low Range DNA Ladder», Fermentas): 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25.

2 - экспрессия гена Aggrecan на 9-е сутки в контрольных клетках;

3- экспрессия гена Aggrecan на 9-е сутки в клетках, подвергнувшихся магнитному воздействию;

4 - экспрессия гена Aggrecan на 12-е сутки в контрольных клетках;

5 - экспрессия гена Aggrecan на 12-е сутки в клетках, подвергнувшихся магнитному воздействию;

6 - экспрессия гена Sox 9 на 9-е сутки в контрольных клетках;

7- экспрессия гена SOX9 на 9-е сутки в клетках, подвергнувшихся магнитному воздействию.

8 - экспрессия гена SOX9 на 12-е сутки в контрольных клетках

9 - экспрессия гена SOX9 на 12-е сутки в клетках, подвергнувшихся магнитному воздействию.

Эти молекулярно-биологические исследования (ПЦР-анализ) подтвердили наличие маркеров хондрогенеза в образцах, подвергшихся воздействию магнитного поля и культивируемых в ППС без дифференцировочных факторов.

Заключение.

1. Воздействие слабым переменным магнитным полем значительно снижает скорость пролиферации мезенхимальных стволовых клеток, начиная с 6-9 суток культивирования по сравнению с контрольными образцами. Причем увеличение индукции магнитного поля ведет к усилению его угнетающего действия на пролиферацию МСК.

2. Молекулярно-биологические исследования (ПЦР) подтвердили наличие маркеров хондрогенеза в образцах, подвергшихся воздействию переменного магнитного поля индукцией 28 и 182 мкТл и культивируемых в полной питательной среде без дифференцировочных факторов.

Литература:

1. Ермоленко Е.М., Ибрагимова Ж.А., Колесникова Т.С., Ходосовская Е.В., Марчук СИ., Семерихина С.Е., Лещенко В.Г. / Влияние переменного магнитного поля на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, см. данный сборник..