

ХОНДРОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МАГНИТНОМ ПОЛЕ.

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

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

Стволовые клетки (СК) – клеточные популяции, обладающие уникальными свойствами: они не специализированы, способны к пролиферации, дифференцировке и асимметрическому делению, способствуют регенерации тканей, мигрируя к зоне повреждения. С практической точки зрения очень важным является изучение влияния различных факторов на дифференциацию и пролиферацию стволовых клеток.

В данной работе исследовано влияние слабого переменного магнитного поля частотой 50 Гц и индукцией 28 мкТл на пролиферацию и хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из жировой ткани [1,2]. 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 составляла около 10%.

Стволовые клетки высевали в лунки 24-луночных планшетов на полную питательную среду (ППС) - контроль и на дифференцировочную среду (ДС). Экспериментальные образцы мезенхимальных стволовых клеток в течение первых 3-х суток культивирования (на ППС и ДС) подвергали воздействию магнитного поля по 30 минут в сутки, затем продолжали культивирование до 13 суток без магнитного поля.

В этой серии экспериментов было сформировано 4 группы образцов:

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

Во всех образцах был проведен количественный анализ содержания МСК, дифференцировавшихся в хондрогенном направлении, путем их окрашивания красителем альциановый голубой. Окрашенные образцы отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе, затем добавляли раствор ДМСО и регистрировали оптическую плотность растворов на длине волны 630нм на планшетном спектрофотометре StatFax. По полученным данным рассчитывали индекс действия (ИД), принимая индекс действия контрольных образцов за 1.

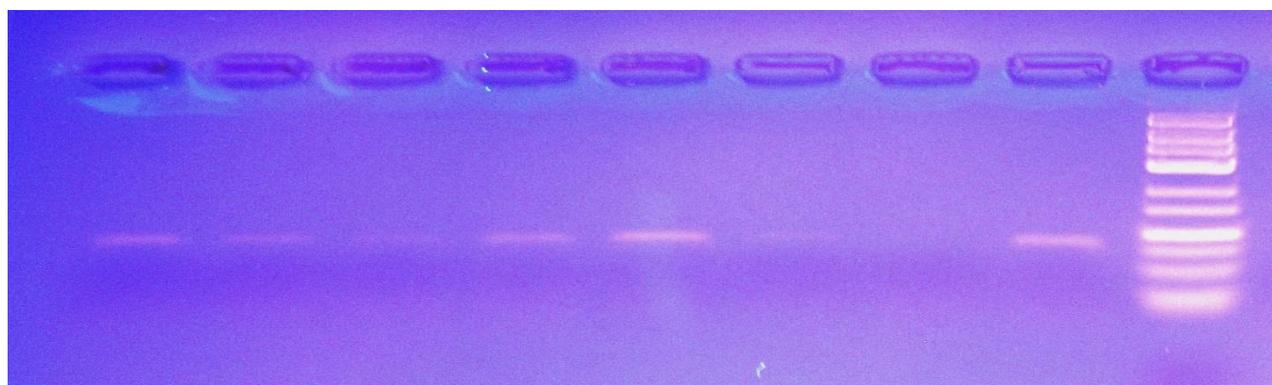
Независимые измерения оптической плотности всех образцов были проведены на 6, 9 и 13-е сутки культивирования. Результаты представлены в табл. 1.

Табл.1. Действие магнитного поля на хондрогенную дифференцировку МСК

Сроки культивирования сутки	Индекс действия (ИД)			
	ППС		ДС	
	Контроль	Магнитное поле	Контроль	Магнитное поле
6	1,0	0,93	1,0	0,82
9	1,0	1,22	1,0	1,39
13	1,0	1,13	1,0	1,34

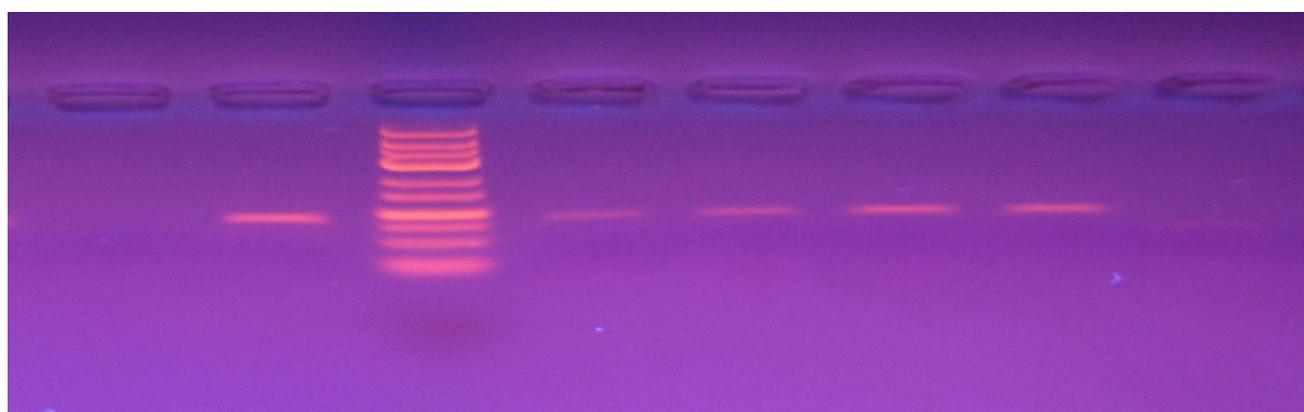
Видно, что на 6-е сутки культивирования в образцах МСК, подвергнувшимся воздействию магнитного поля, произошло снижение индекса хондрогенной дифференцировки, однако на 9-е сутки культивирования индекс действия достоверно увеличился в

этих образцах МСК, особенно в дифференцировочной среде. На 13-е сутки культивирования наблюдалось некоторое снижение уровня хондрогенной дифференцировки в культурах клеток, подвергшихся воздействию магнитного поля, однако индекс действия по-прежнему был выше, чем в контрольных образцах. Эти результаты подтверждены и с помощью ПЦР – анализа генетических маркеров хондрогенной дифференцировки COL2A1, ACAN (Aggrecan), SOX9 (рис.1 и 2).



ППС ППС+М ДС ДС+М Хондр Контр Вн.контр Хрящ Маркеры

Рис.1. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа экспрессии гена COL2A1 в образцах на 6-е сутки культивирования.



Вн.контр. Хрящ Маркеры ППС ППС+М ДС ДС+М МСК-контр

Рис.2. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа экспрессии гена ACAN в образцах на 13-е сутки культивирования.

Было исследовано также влияние слабого переменного магнитного поля на **пролиферацию** МСК, без добавления биохимических факторов, влияющих на их хондрогенную дифференцировку. В этих исследованиях на культуры МСК, выделенные из жировой ткани, воздействовали переменным магнитным полем частотой 50 Гц, индукцией 28 мкТл и 182 мкТл. Были исследованы 4 группы образцов:

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;
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 с помощью ПЦР-анализа 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 28 мкТл и 182 мкТл, представлены в табл. 2 и 3, а соответствующие гистограммы – на рис.3 и 4.

Табл.2. Снижение пролиферации МСК под действием магнитного поля в 28 мкТл по сравнению с контролем.

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
% от контроля	105%	70%	58%	61%

Табл 3. Снижение пролиферации МСК под действием магнитного поля в 182 мкТл по сравнению с контролем

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
% от контроля	60%	59%	77%	67%

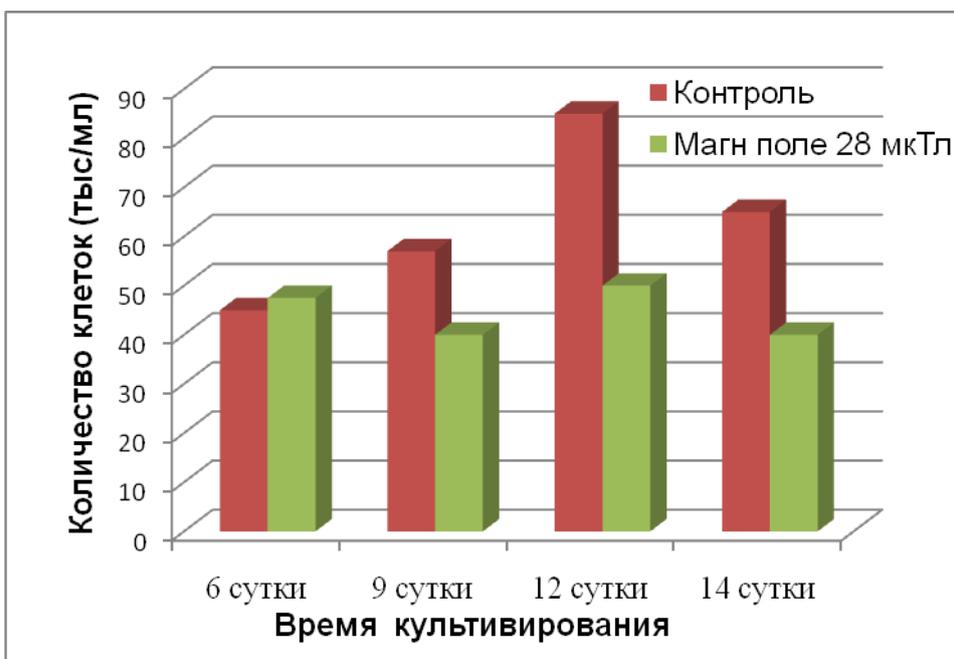


Рис.3 - Влияние магнитного поля 28 мкТл на пролиферацию МСК

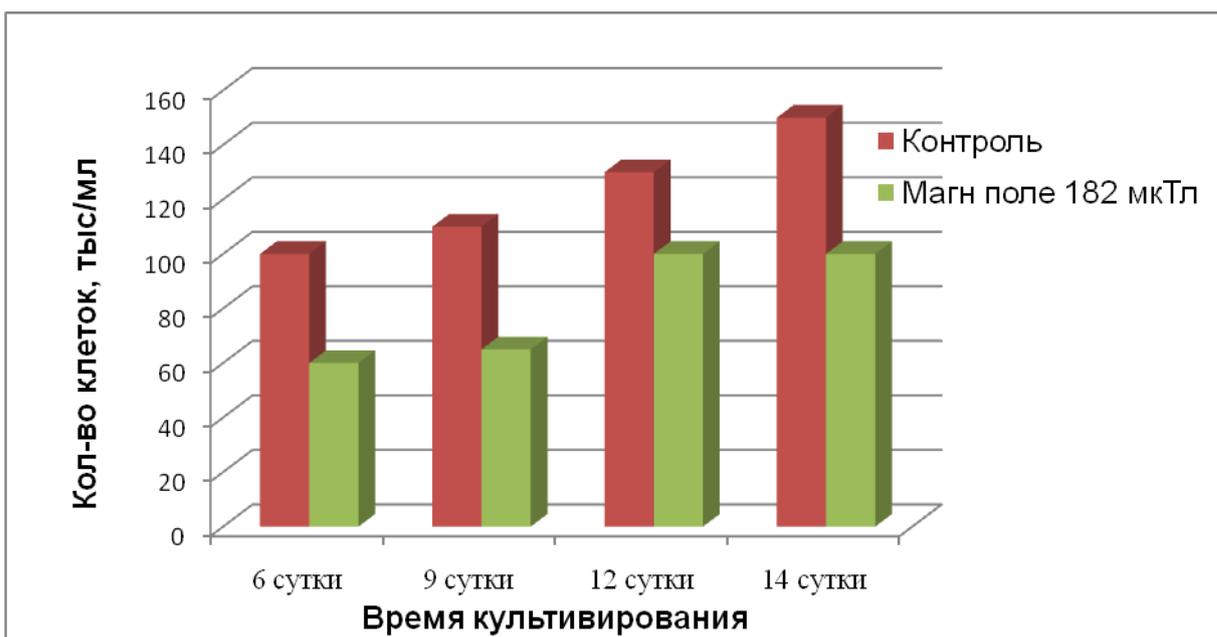


Рис. 4 - Влияние магнитного поля 182 мкТл на пролиферацию МСК.

Как видно из таблиц и гистограмм, скорость пролиферации клеток, подвергшихся воздействию магнитного поля, значительно **снижается** по сравнению с контрольными образцами уже на 6 сутки культивирования как в магнитном поле индукцией 28 мкТл, так и в поле индукцией 182 мкТл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Показано, что под воздействием слабого **переменного магнитного поля** частотой 50 Гц и индукцией 28 мкТл происходит **увеличение хондрогенной дифференцировки МСК** и **значительное снижение скорости пролиферации мезенхимальных стволовых клеток** начиная с 6-9 суток культивирования по сравнению с контрольными образцами.

Литература:

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