

Совместное применение анатоксина с полиакриловой кислотой обеспечивает усиление иммунного ответа.

Ключевые слова: колибактериоз, эшерихиозный анатоксин, титр антител.

Kovalenko L.M, Kovalenko A.I., Kovalenko A.A. Study of the effects of E.coli anatoxin on animals in the laboratory

From the results it was shown that the most active accumulation of antibody titers occurs with the introduction of lower doses of inactivated toxin complex of E.coli .Length of circulation of anatoxic antibodies of E.coli do not exceed 14 days. Combined use of tetanus toxoid with polyacrylic acid provides enhanced immune response.

Keywords: colibacillosis, anatoxin of E.col, antibody titer.

Дата надходження в редакцію: 16.02.2013 р.

Рецензент: д.вет.н., професор В.Ю. Кассіч

УДК 619:611.013:57.085.2:636

**ОПТИМАЛЬНІ УМОВИ ВИДІЛЕННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ АДГЕЗИВНОЇ ФРАКЦІЇ
МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШІ**

А. Й. Мазуркевич, д.вет.н., професор

Л. В. Кладницька, к.вет.н., доцент

В. В. Ковпак В.В., к.вет.н.

Національний університет біоресурсів і природокористування України

У статті розглядається вплив параметрів центрифугування адгезивної фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку миші в градієнті щільності фіколу 1,074, 1,076, 1,078, 1,080 з відцентровою силою 300 g з метою забезпечення отримання фракції клітин, найбільш збагаченої на мезенхімальні стовбурові клітини. Також розглядаються умови отримання клітин кісткового мозку, за яких їх суміш найбільш сприяє проліферативній активності МСК миші.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, кістковий мозок, проліферативна активність, миші.

Постановка проблеми. Для формування та росту колоній мононуклеарних клітин кісткового мозку необхідна певна концентрація та співвідношення речовин та факторів, які виділяються у середовище в процесі життєдіяльності самими клітинами. За різних методик отримання співвідношення та кількість вказаних речовин неоднакова, що у свою чергу впливає на формування та ріст колоній клітин.

Відомо, що клітини багатоклітинного організму потребують обміну інформацією між собою для регулювання свого розвитку, організації в тканини, контролю процесів росту та ділення, для координації функцій. До складу кісткового мозку входять фібробласти, макрофаги, адипоцити, остеобласти, остеокласти, ендотеліальні клітини, мезенхімальні та гемопоетичні стовбурові клітини, а також їх комітовані нащадки [3,4].

Життєдіяльність клітин у культурі значно спрощена порівняно з функціонуванням в організмі, і, як правило, обмежена лише поділом. Взаємодія клітин кісткового мозку підтримує перебування мезенхімальних стовбурових клітин у неактивній фазі мітозу (G_0) – у, так званому, дормантному стані, а вихід їх з цього стану, перехід у мітотичний цикл регулюється зміною міжклітинних сигналів [5,1]. Міжклітинна взаємодія відбувається за допомогою гормонів, нейромедіаторів, та гістогормонів. Очевидно, останній тип міжклітин-

ної передачі сигналів присутній між клітинами кісткового мозку, а сигнали, що надходять до клітин кісткового мозку і сповіщають про порушення гомеостазу в організмі, надходять за допомогою гормональних та нейромедіаторних речовин. Ці сигнали і дають команду, яка стимулює вихід певної кількості стовбурових клітин з дормантного стану, які в подальшому стають на шлях диференціювання та мігрують в зону патологічного процесу під дією все тих же міжклітинних сигналів [2,3]. Одні й ті ж сигнальні молекули можуть викликати у клітин-мішеней неоднакову відповідь. В одних випадках це пов'язано з тим, що сигнальна молекула зв'язується з різними білками-рецепторами, в інших випадках вони зв'язуються з однаковими білками-рецепторами, але активують в різних клітинах різні механізми відповіді. Деякі реакції клітин бувають поступовими та посилюються прямо пропорційно збільшенню ліганду. Однак існує інша група клітин, яка реагує на збільшення концентрації сигнальної речовини за принципом «все або нічого»; в цьому випадку у клітин-мішеней не спостерігається ніяких змін доки концентрація ліганду не досягне порогового рівня, а з досягненням його - відразу розпочинається максимальна реакція [6].

Як уже відмічалось, однією з ознак МСК є їх висока адгезивна здатність до культурального посуду при культивуванні. Це дозволило, в свій

час, О.Фриденштейну відділити МСК від гемопоетичних клітин. Слід відмітити, що при використанні цієї властивості отримувана популяція клітин неоднорідна та містить інші клітини, що також мають адгезивні властивості і, які можуть, за даними окремих дослідників, пригнічувати проліферативну активність отримуваних МСК [7,8].

Матеріали і методи. Метою дослідження було визначити оптимальні умови виділення та культивування клітин моноклеарної фракції кісткового мозку миші з високою проліферативною активністю.

Дослідження проводили на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології тварин НУБіП України.

Для дослідження використовували моноклеарну фракцію клітин кісткового мозку мишей, віком 28 діб, лінії Black. Дослідні тварини утримувалися на стандартному раціоні, були клінічно здорові. Експерименти на тваринах проведені у відповідності до вимог загальних етичних принципів експериментів на тваринах, схвалених І Національним конгресом з біоетики. Кістковий мозок відбирали зі стегових кісток мишей після етаназії методом цервікальної дислокації хребта під ефірним наркозом.

Нами було досліджено 16-ть комбінацій отримання клітин моноклеарної фракції кісткового мозку миші з високою проліферативною активністю. При цьому було досліджено чотири комбінації методу розділення суспензії клітин

кісткового мозку в 4-ох градієнтах щільності фіколу (перша - 1,074, друга - 1,076, третя - 1,078, четверта - 1,080) з величиною відцентрової сили 300 g та культивування клітин *invitro* на культуральних середовищах DMEM, RPMI, 199 з солями Ерла, 199 Нерес, з додаванням 20% FBS (фетальна сироватка телят); 10 мкл/см³ – антибіотика-антимікотика.

Клітини висівали зі щільністю 250 x 10³ на см² культурального посуду. Культивування клітин здійснювали в чашках Петрі (d=60 мм) в CO₂-інкубаторі при температурі 37 °C та концентрації CO₂ – 5%. Оцінку ефективності методів виділення клітин моноклеарної фракції кісткового мозку проводили на основі формування колоній та проліферативної активності клітин за допомогою мікроскопу Axiovert 40 (Zeiss). Оцінку адгезивних властивостей клітин, росту та формування колоній, утворення моношару клітин моноклеарної фракції кісткового мозку проводили кожну добу.

Результати досліджень. За різних комбінацій методу розділення суспензії первинного матеріалу в 4-ох градієнтах щільності фіколу отримали неоднакову кількість клітин моноклеарної фракції кісткового мозку (табл.1). Як видно з таблиці 1 показники градієнту щільності фіколу та кількості клітин моноклеарної фракції кісткового мозку прямо пропорційні.

На 4-ту добу культивування первинного матеріалу ми спостерігали появу поодиноких клітин, які розпластовувались на дні культурального посуду та вступали в мітотичний поділ (рис.1).

Таблиця 1.

Кількість клітин моноклеарної фракції кісткового мозку, отриманих на різних градієнтах щільності фіколу, клітин x 10⁷

№ досліджу	Градієнт щільності фіколу,	Кількість клітин, шт
1	1,074	2,8
2	1,076	3,2
3	1,078	4,1
4	1,080	4,4

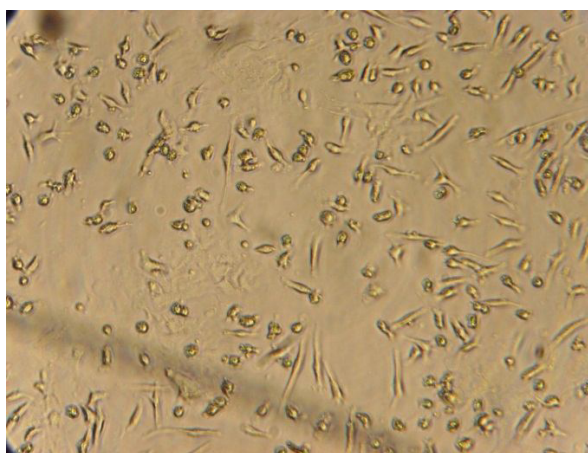


Рис. 1. МСК миші, культивовані у культуральному середовищі DMEM, 4-та доба культивування.

Порушення генетично закладеної комбінації клітин кісткового мозку змінює схему міжклітинної взаємодії, чим спричинює іншу поведінку клітин,

яка суттєво залежить від їх комбінації, що було відмічено нами при центрифугуванні в градієнтах щільності фіколу різної величини. Очевидно, за

таким механізмом відбувається вихід МСК з дормантного стану у первинній культурі. Це може бути поясненням отриманих нами результатів з

досить високим відхиленням між групами дослідів (табл. 2).

Таблиця 2

Кількість клітин, отриманих на 9-й день культивування з первинного матеріалу на культуральних середовищах DMEM, RPMI, 199 з солями Ерла, 199 HEPES за різних градієнтів щільності фіколу, клітин $\times 10^5$

Культуральне середовище	Показник градієнту щільності фікола			
	1, 074	1, 076	1, 078	1, 080
199 E	1,67	1,50	1,50	1,00
199 HEPES	1,16	0,78	0,83	0,72
DMEM	7,11	6,33	5,56	3,56
RPMI	6,56	5,78	5,17	4,94

Із наведених даних таблиці 2 з'ясовано, що параметр центрифугування в градієнті щільності фіколу 1,074 є найбільш оптимальним для отримання популяції клітин з найвищою проліферати-

вною активністю, а саме: на 9-ту добу культивування з отриманої популяції клітин був уже сформований суцільний моношар (рис.2).

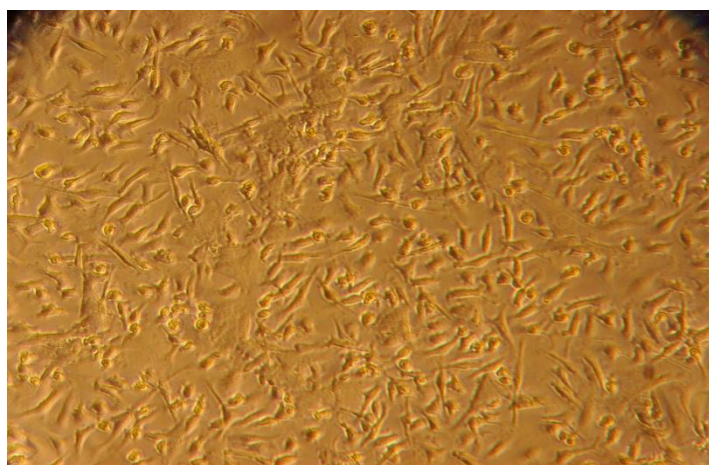


Рис. 2. МСК миші, культивовані у культуральному середовищі DMEM, за параметру центрифугування первинного матеріалу у градієнті щільності фіколу 1,074, 9-та доба культивування

Клітини зразків з градієнтом щільності 1,076 покривали поверхню культурального посуду лише відповідно на 45 та 60% (рис.3, рис.4). Після 9-добового культивування в зразках дослідів за

параметрів центрифугування первинного матеріалу у градієнті щільності фіколу 1,078 та 1,080 нами отримано формування моношару клітин у межах 40–50 %.



Рис. 3. МСК миші за умов культивування у середовищі RPMI, за параметру центрифугування первинного матеріалу у градієнті щільності фіколу 1,076, 9-та доба культивування

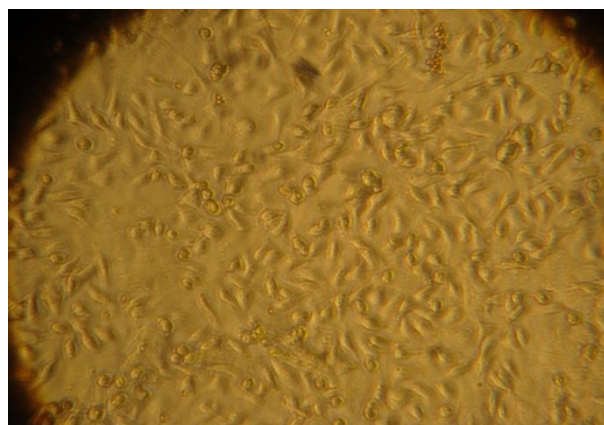


Рис. 4. МСК миші, культивовані у культуральному середовищі DMEM, за параметру центрифугування первинного матеріалу у градієнті щільності фіколу 1,076, 9-та доба культивування

Висновки. Таким чином, параметри центрифугування суспензії клітин кісткового мозку миші в градієнті щільності фіколу 1,074 з відцентровою силою 300 g забезпечують отримання фракції клітин, найбільш збагаченої на МСК. Суміш клітин кісткового мозку, отримана нами за вказаних параметрів, найбільш сприяє проліферативній активності МСК миші. Очевидно, за цих умов в отримуваній фракції виявляється більша

кількість МСК; разом з тим не виключено, що активність клітин у цій фракції зумовлена зниженням можливості потрапляння попередників макрофагів, які, як відомо, здатні проявляти інгібуючу дію на проліферативну активність МСК.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи одержані результати одним з актуальних питань є визначення проліферативної активності МСК миші, отриманих за вказаних умов.

Список використаної літератури:

1. Bianco P. Bonemarrowstromalstemcells: nature, biology, andpotentialapplications/ P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthoset.al. // Stemcells. – 2001. – № 19. – P.180–192.
2. Кухарчук А.Л. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоетические стволовые клетки / Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. – Черновцы: Золоті Литоври, 2004. – 505с.
3. Мушамбаров Н.Н. Молекулярная биология/ Н.Н. Мушамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Медицинское информационное агенство, 2003. – 535 с.
4. Мушамбаров Н.Н. Молекулярная биология/ Н.Н. Мушамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Медицинское информационное агенство, 2003. – 535 с.
5. Hart P.H. Mononuclear cell factors, that inhibit fibroblast collagen synthesis. *In vitro* conditions determine their production and Expression / P.H. Hart, L.W. Powell, W.G.E. Cooksley [et al.] // Scand. J. Immunol. – 1985. – Vol.18. – P.51–58.
6. Metzger Z. Suppression of fibroblast proliferation by activated macrophages: Involvement of H₂O₂ and a non-prostaglandin E product of the cyclooxygenase pathway/ Z. Metzger, J.T. Hoffeld, J.J. Oppenheim// Cell. Immunol. –1986. –Vol.100. – № 2. –P.501–514.
7. Чупикова Н.И. Получение и биологическая характеристика мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга человека и создание на их основе костных структур: дис. канд. биол. наук : 03.00.23/ Чупикова Наталия Игоревна.– М, 2007.–133с.
8. Фриденштейн А.Я. Проллиферативные и дифференцировочные потенции склетогенных костномозговых колониеобразующих клеток/А.Я. Фриденштейн, Р.К. Чайлахян, Ю.В. Герасимов // Цитология. – 1986. – №28(3). – С.341–349.
9. Fridenshtein A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay/ A. Fridenshtein, N. Kulagina et.al// Exp. Hematology.–1974.– №2.–P.83–91.

Мазуркевич А.И., Кладницкий Л.В., Колпак В.В. Оптимальные условия выделения и культивирование адгезивной фракции мононуклеарных клеток костного мозга мыши.

В статье рассматривается влияние параметров центрифугирования адгезивной фракции мононуклеарных клеток костного мозга мыши в градиенте плотности фикола 1,074, 1,076, 1,078, 1,080 с отцентровой силой 300 g с целью обеспечения получения фракции клеток, наиболее обогащенной мезенхимальными стволовыми клетками. Так же рассматриваются условия получения клеток костного мозга, при которых их смесь более способствует пролиферативной активности мезенхимальных стволовых клеток мыши.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, костный мозг, мыши.

Mazurkevich A.I., Kladnytska L.V.Kolpak V.V. Optimal conditions of isolation and cultivation of fraction adhesion of mononuclear bone marrow cells of mouse

The influence centrifuge index on mouse bone marrow adhesive fraction mononuclear cells in 1,074, 1,076, 1,078, 1,080 ficol closeness gradient with centrifugal force 300 g with purpose accepting cells fraction which contain more mesenchimale stem cells is telling in this article.

Key words: mesenchimale stem cells, bone marrow, mouse

Дата надходження в редакцію: 23.01.2013 р.

Рецензент: к.вет.н., професор Г.А. Зон