

Как видно на электрофореграмме, СОТС «ЭК-2М» (трэк 1) и «СК-1» (трэк 2) не вызывают изменений электрофоретической подвижности ДНК фага λ , так как она находится по степени миграции под воздействием электрического тока на уровне, соответствующему отрицательному контролю (трэк 3), что свидетельствует об отсутствии ДНК-повреждающей активности (генотоксичности) у обеих композиций. В то время как под воздействием азида натрия (трэк 4) и 9-аминоакридина (трэк 5), которые служили в качестве позитивного контроля и являются веществами с доказанной генотоксичностью, отмечаются ДНК-повреждающие эффекты, проявляющиеся миграцией высвобожденных фрагментов ДНК из клетки.

Выводы

СОТС «ЭК-2М» и «СК-1» не проявляют потенциальных мутагенных свойств в тесте Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* ТА 1535, ТА 97, ТА 98, ТА 100 и ТА 102 в условиях с полной метаболической активацией и без нее.

ДНК-повреждающим действием в репарационном тесте на *Escherichia coli* и на модели электрофореза с использованием ДНК фага λ СОТС «ЭК-2М» и «СК-1» не обладают.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Трахтенберг, И. М. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей / И. М. Трахтенберг, Л. А. Тимофиевская, И. Я. Квятковская; отв. ред. И. М. Трахтенберг. — Рига: Зинатне, 1987. — 172 с.
2. Половинкин, Л. В. Исследование потенциальной способности терпеновых соединений к индукции отдаленных эффектов в опытах *in vitro* и *in vivo* / Л. В. Половинкин // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. — 2005. — № 2. — С. 34–39.
3. Абилов, С. К. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластомогенных свойств химических соединений / С. К. Абилов, Т. Г. Пороменко // Итоги науки и техники / ВИНТИ. Сер. Токсикология. — М., 1986. — Т. 14. — 171 с.
4. Руководство по испытанию химических веществ ОЭСР № 471 (21.07.1997 г.).
5. МУК. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем. — М., 1985.
6. Прогнозирование генотоксического действия некоторых природных и синтетических терпенов циклопентанового ряда / А. А. Ушков [и др.] // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / под ред. С. М. Соколова, В. Г. Цыганкова. — Минск: Технопринт, 2001. — С. 341–344.
7. Метилирование ДНК и канцерогенез / Б. А. Лихтенштейн [и др.] // Биохимия. — 2001. — № 66. — С. 235–255.

Поступила 13.06.2013

УДК 616.36: 602.9: 575

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ ГЕПАТОЦИТ-ПОДОБНЫМИ КЛЕТКАМИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ ИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

А. Г. Скуратов, Д. Р. Петренев, А. Н. Кондрачук

Гомельский государственный медицинский университет

Цель: исследовать экспрессию маркерных генов гепатоцит-подобными клетками, дифференцированными из мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Материалы и методы. Белые крысы линии Вистар, костномозговые МСК; изолированные гепатоциты крысы, полученные методом ферментативной перфузии печени; дифференцировка МСК в гепатоцитарном направлении; световая микроскопия; оценка экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты. Наблюдаемые изменения в профиле экспрессии генов на протяжении этапов дифференцировки свидетельствуют о присутствии в культуре МСК клеток, дифференцированных в гепатоцитарном направлении. Экспрессия генов Carbox, Krt18, Krt19 и Cyt1A1 в большой степени зависит от состава среды, не является постоянной и носит индуцибельный характер. Представляется важным дальнейший поиск молекулярно-генетических маркеров дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении. Полученные результаты демонстрируют необходимость систематизации имеющихся данных об изменениях уровня экспрессии генов при дифференцировке МСК в гепатоциты с целью унификации условий оценки профиля экспрессии генов.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, изолированные гепатоциты, гепатоцитарная дифференцировка, экспрессия генов.

EXPRESSION OF MARKER GENES BY HEPATOCYTE-LIKE CELLS DIFFERENTIATED FROM MESENCHYMAL STEM CELLS

A. G. Skuratov, D. R. Petrenyov, A. N. Kondrachuk

Gomel State Medical University

Objective: to investigate the expression of marker genes by hepatocyte-like cells differentiated from mesenchymal stem cells (MSCs).

Materials and methods. Wistar white rats, bone marrow MSCs, isolated hepatocytes of the rats were obtained by enzymatic perfusion of liver; differentiation of MSCs in hepatocyte direction; light microscopy; investigation of expression of genes by polymerase chain reaction (PCR).

Results. The observed changes in the gene expression profile during the stages of differentiation indicate the presence of the cells differentiated into hepatocytic direction in MSCs culture. The expression of Carbox, Krt18, Krt19 Cyt1A1 genes depends on the composition of the medium and is not permanent and inducible in nature. It is

important to go on searching for the molecular markers of MSCs differentiation in the hepatocytic direction. These results demonstrate the necessity to systematize the available data on the changes in the levels of gene expression during MSCs differentiation into hepatocytes to unify the conditions of assessment of the gene expression profiling.

Key words: mesenchymal stem cells, isolated hepatocytes, differentiation into hepatocytic direction, gene expression.

Введение

В последние годы активно ведутся научные разработки в области клеточной трансплантологии как альтернативе органной трансплантации при печеночной недостаточности. Могут быть использованы как зрелые гепатоциты, так и стволовые клетки, дифференцированные в гепатоцитарном направлении [1, 2].

Известна высокая гетерогенность параметров мезенхимальных стволовых клеток (МСК), используемых в различных протоколах дифференцировки и трансплантации [3]. В этой связи типирование культур МСК является одной из важнейших задач в этой области. Общепринято, что характерной особенностью дифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки является экспрессия различных генов, характерных для собственно гепатоцитов или для выполнения свойственных им функций. Наиболее часто анализируется экспрессия генов, кодирующих ферменты глюконеогенеза, детоксикации ксенобиотиков, белки плазмы крови и гепатоцитарные цитокератины. Однако зачастую экспрессия этих генов является индуцибельной и может наблюдаться в различных типах клеток под воздействием ряда факторов среды. Более того, возможно, изолированные из органа и культивируемые *in vitro* гепатоциты быстро теряют свой характерный профиль экспрессии генов и при отсутствии специфических факторов окружения погибают.

Цель работы

Исследовать экспрессию маркерных генов гепатоцит-подобными клетками, дифференцированными из мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Материалы и методы

Объектом исследования являлись лабораторные крысы линии Wistar, ядро F (возраст 6–8 месяцев, масса тела 180–200 г). МСК выделяли из костного мозга и культивировали по стандартной методике протокола [4].

Для верификации полученных результатов анализировалась экспрессия генов, маркерных для культуры мезенхимальных стволовых клеток, направленно дифференцированных в гепатоцит-подобные клетки.

Дифференцировка МСК в гепатоцит-подобные клетки

Для разработки протокола дифференцировки МСК использовали принципы, описанные в источниках [5, 6]. Мезенхимальные клетки второго пассажа высаживали во флаконы T-25 (Sarstedt, Германия) и 6-луночные планшеты (GreinerBioOne, Германия) для получения конечной плотности клеток 2×10^4 кл/см². Далее последовательно проводили инкубацию клеток в средах, содержащих комбинации дифференцировочных факторов, перечисленных в таблице 1. На этапах 2 и 3 проводили 50 % смену среды каждые 3–4 сутки.

Таблица 1 — Состав среды и продолжительность этапов дифференцировки МСК

№ этапа	Продолжительность этапа	Состав культуральной среды
—	—	Базовая среда: среда DMEM/HamF12 (Invitrogen-GIBCO, США) с добавлением смеси антибиотиков: пенициллин — 100 U/ml, стрептомицин — 100 µg/ml, амфотерицин В — 0,25 µg/ml («Sigma», США). Среду стерилизовали фильтрованием (0,22 µm) и хранили в холодильнике
1	3 сут.	Базовая среда с добавлением 1 % FBS (HyClone, ThermoFisher), 3 % BSA, 10 % FBS, 2µM-glutamine, 10 ng/ml βFGF
2	8 сут.	«Diff1»: базовая среда с добавлением 10 % FBS, 2µM-glutamine, βFGF (10 нг/мл.), EGF (10 нг/мл.), HGF (20 нг/мл.)
3	>10 сут.	«Diff2»: базовая среда с добавлением HGF (20 нг/мл.), дексаметазона (0,1 µM), 1 % ITS, никотиновой кислоты (0,9 мг/мл), 0,1 % демитилсульфоксида

При определении степени экспрессии генетических маркеров гепатоцит-подобных клеток отрицательным контролем служила культура МСК до начала их дифференцировки (день 0). Группой сравнения были культуры МСК, находившиеся в тех же условиях (режимы культивирования, культуральная среда), но без добавления ростовых дифференцировочных факторов

HGF, EGF, βFGF. В качестве положительного контроля использовались биоптаты тканей нативной печени и первичные гепатоциты, выделенные после перфузирования и ферментативной обработки печени коллагеназой II типа. На промежуточных сроках и в конце каждого этапа культивирования часть культур МСК из планшетов T-25 использовали для выделения мРНК.

Совместное культивирование МСК костного мозга и гепатоцитов

Выделение гепатоцитов. Гепатоциты были изолированы с помощью 2-стадийной ферментативной перфузии печени, описанной в работе Seglen и адаптированной в нашей лаборатории [7].

Для проведения совместного культивирования МСК и первичных гепатоцитов использовали систему, состоящую из 6-луночного планшета и пластиковых вставок с полупроницаемой мембраной с диаметром пор 0,4 μm (ThinCert, GreinerBioOneInc.). МСК вносили в лунки планшета для получения плотности 2×10^4 клеток/ cm^2 . Свежевыделенные гепатоциты вносили в камеру вставки, таким образом МСК и гепатоциты оказывались разделенными мембраной, проницаемой для растворимых факторов и среды, но предотвращающей перемещение клеток между компартментами. Этапы культивирования и дифференцировочные среды использовали такие же, как и в протоколе направленной дифференцировки МСК.

Анализ экспрессии маркерных генов в культурах МСК

Выделение РНК, синтез кДНК и проведение ПЦР На промежуточных и конечных этапах дифференцировки образцы культур МСК лизировали в 300 мкл раствора набора «РИБО-золь-В» (АмплиСенс, Россия). Выделение РНК производили в соответствии с рекомендациями производителя. Обратную транскрипцию проводили с применением набора #K1612 (Fermentas, Литва). На всех этапах качество выделения контролировали спектрофотометрически на программно-аппаратном комплексе «NanoDrop» (США). Специфические праймеры для анализа экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени были подобраны с помощью программы «Primer Express(r) Software», v3.0 (Applied Biosystems) в соответствии с рекомендациями [8] и синтезированы фирмой «Праймтех» (Беларусь). ПЦР проводили на программно-аппаратном комплексе «Rotor Gene», 3000 (Corbett Research, Австралия). Для анализа экспрессии генов применяли метод ПЦР в реальном времени (англ. RealTime PCR) с контролем процес-

са по флуоресценции красителя SYBR Green.

При проведении ПЦР кроме кДНК анализируемых образцов в ходе каждой реакции использовали дополнительные «отрицательный» и «положительный» контроль. В качестве отрицательного образца использовали воду для ПЦР, в качестве положительного — стандартный калибратор кДНК гена GAPDH.

Анализ данных ПЦР в реальном времени. Препараты кДНК образцов изначально различались по количественному содержанию продуктов обратной транскрипции (из-за весовых и гистологических различий исследуемого биологического материала, эффективности выделения РНК из разных проб и др.). Для сопоставления получаемых данных экспрессии исследуемых генов в образцах, на первом этапе обработки данных ПЦР в реальном времени проводили нормализацию (уравнивание) результатов по генам, обладающим одинаковым уровнем экспрессии в тканях, вне зависимости от ее физиологического состояния. В качестве нормализаторов выступали гены, детерминирующие основные этапы метаболизма клетки — «гены домашнего хозяйства» (англ. «housekeeping genes»). Основными требованиями к выбору гена-нормализатора были: применимость к данному типу ткани, сходное значение показателя эффективности амплификации с изучаемыми генами [9]. В качестве основного гена-нормализатора использовали GAPDH и β -actin — в качестве дополнительного.

Оценку уровня экспрессии генов в анализируемом образце проводили на основе анализа динамики интенсивности флуоресценции и расчета значений пороговых циклов появления продуктов амплификации при заданном уровне чувствительности (рисунок 1). Далее для каждого анализируемого образца рассчитывали разницу (ΔCt) между значениями пороговых циклов различных генов и гена-нормализатора (GAPDH). Полученное значение характеризует относительный уровень экспрессии гена в конкретном образце и позволяет производить сравнение уровней экспрессии генов в различных образцах.

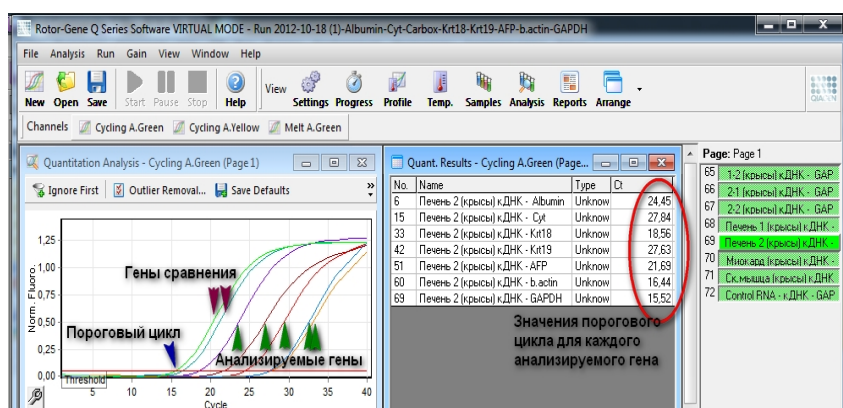


Рисунок 1 — Вид окна анализа данных, полученных при проведении ПЦР

Контроль качества постановки анализа методом ПЦР в реальном времени для каждого образца осуществляли с помощью анализа кривых плавления продуктов ПЦР. Алгоритм анализа и примеры кривых плавления представлены на ри-

сунке 2. Для подтверждения специфичности проведения ПЦР использовали электрофоретическое разделение продуктов реакции в 1,7 % агарозном геле по стандартной схеме с окраской геля раствором бромистого этидия.

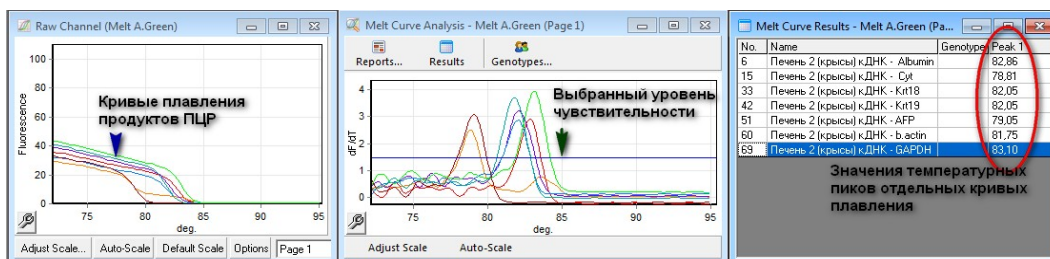


Рисунок 2 — Пример первичных данных и анализа кривых плавления продуктов ПЦР для проверки специфичности выполненного анализа*.

*Присутствие только одного пика свидетельствует о получении одного продукта амплификации, дополнительные — о наличии побочных продуктов амплификации. Совпадение значения температуры полученного пика плавления с расчетными данными подтверждает специфичность проведения анализа

Все подобранные пары праймеров были проверены по алгоритму, подтверждена их специфичность и определена температура плавления продуктов ПЦР. Например, одна из представленных пар

праймеров (Cyt) не обладала необходимой специфичностью, что подтвердилось результатами обоих методов контроля качества, и была заменена на альтернативный вариант (Cyt P450 89b.p. (рисунок 3).

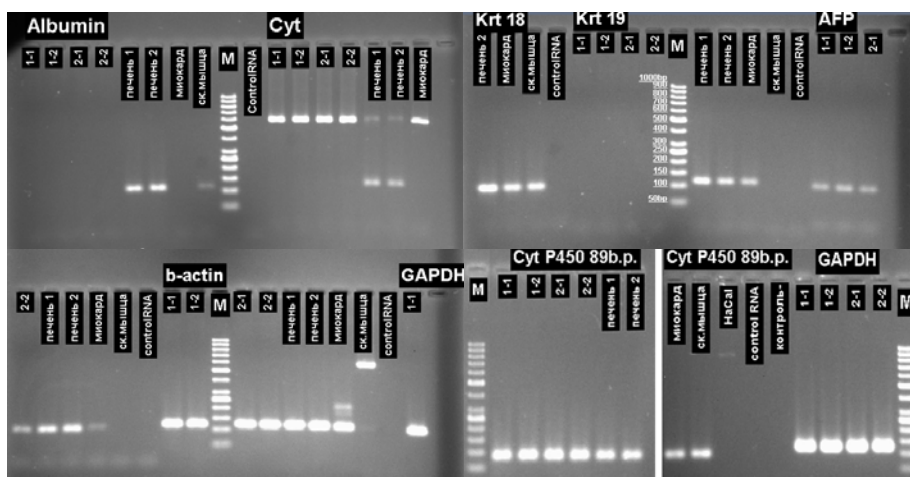


Рисунок 3 — Подтверждение специфичности ПЦР методом горизонтального электрофореза продуктов амплификации в агарозном геле

Результаты и их обсуждение

Профиль экспрессии генов МСК при гепатоцитарной дифференцировке

На рисунке 4 представлены профили экспрессии некоторых гепатоцит-ассоциированных генов, полученные при анализе мРНК, выделенных из образца ткани печени и собственно гепатоцитов через 4 часа после их выделения. Хорошо заметно, что экспрессия генов AFP, Krt19, Carbox и ALB, ассоциируемых с гепатоцитарной дифференцировкой МСК, в первичных гепатоцитах снижается в тысячи раз уже после 4 часов извлечения клеток из организма. В то же время экспрессия генов детоксикации ксенобиотиков (Cyt1A1) может возрасти, очевидно, вследствие изменения условий пар-

циального давления кислорода и контакта с незнакомыми факторами среды.

Упомянутые выше изменения в профиле экспрессии генов первичных гепатоцитов следует учитывать при использовании метода ПЦР для типирования культур МСК, так как текущий профиль экспрессии может быть отражением совокупности действия различных факторов в ограниченный промежуток времени, но не отражать направленность процессов дифференцировки.

Вполне вероятно, что профиль экспрессии генов клеток, культивируемых *in vitro*, во многом зависит от состава среды и особенностей партии эмбриональной сыворотки. Например, профили экспрессии анализируемых генов были очень схожими для МСК костномозгового

происхождения и фибробластов кожи при рутинном культивировании их в базовой полной среде (рисунок 5). Единственное значимое от-

личие — это экспрессия гена AFP, очевидно, связанная с мезенхимальным происхождением этих клеток и с их статусом дифференцировки.

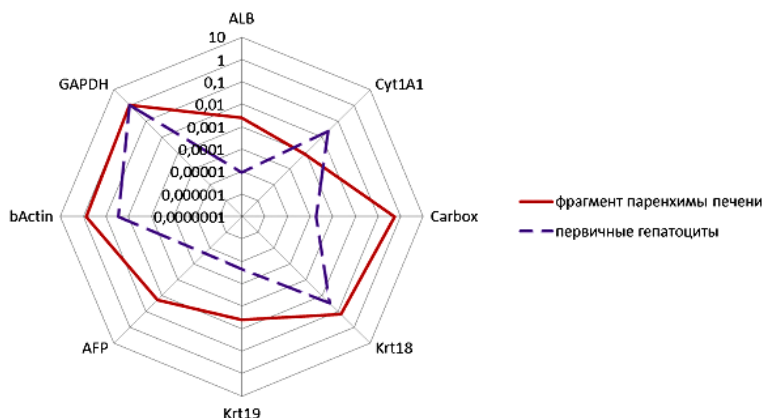


Рисунок 4 — Профиль относительной* экспрессии генов в образцах мРНК изолированных из фрагмента паренхимы печени и первичных гепатоцитов через 4 часа после выделения и культивирования Альбумин (ALB), цитохром Р-450 1A1 (Cyt1A1), фосфоенолпируват карбоксилаза (Carbox), цитокератин 18 (Krt18), цитокератин 19 (Krt19), α -фетопротейн (AFP), β -актин (bActin), глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH).

*Логарифмическая шкала показывает, сколько копий генов присутствует в образце из расчета на одну копию гена GAPDH. Экспрессия ниже предела детекции — 10⁻⁷.

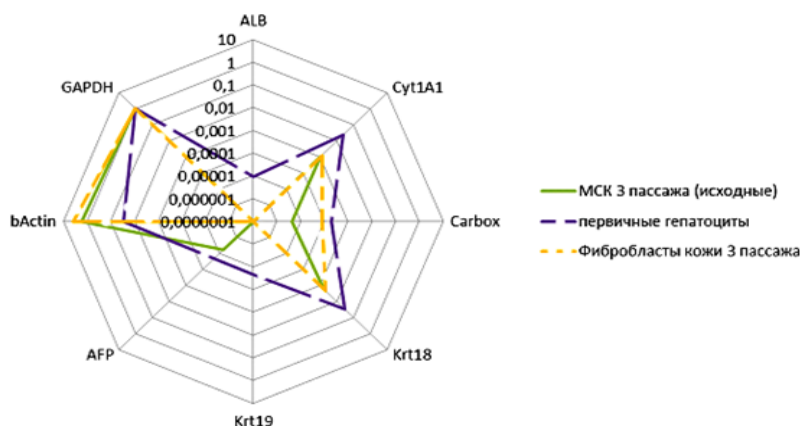


Рисунок 5 — Профиль относительной экспрессии генов в образцах мРНК, изолированных из первичных гепатоцитов через 4 часа после выделения и культивирования, а также МСК и фибробластов кожи

На протяжении всего срока дифференцировки происходили относительно незначительные изменения в профиле экспрессии генов. Отмечали рост уровня относительной экспрессии гена bActin на протяжении всего срока культивирования практически во всех образцах. Разнонаправленные изменения в уровне экспрессии AFP наблюдали в контрольных культурах МСК и в МСК в дифференцировочных средах. В контрольных культурах наблюдали постепенное снижение уровня экспрессии этого гена, в то время как под воздействием факторов дифференцировочных сред уровень экспрессии AFP с МСК повышался. Однако на последнем этапе уровень экспрессии AFP дифференцируемых клеток стал снижаться и приблизился к таковому у недедифференциро-

ванного контроля. Экспрессия генов Carbox и Krt19 изменялась немонокотонно. Как правило, смена среды или внесение новых компонентов в состав сред совпадали с появлением экспрессии Krt19 и изменением уровня экспрессии Carbox и Cyt1A1. Включение ДМСО в состав среды Diff1 привело к увеличению уровня экспрессии генов AFP, Krt19, Krt18, а также Cyt (рисунок 6).

Для оценки влияния уровня глюкозы в среде на профиль экспрессии генов в МСК мы инкубировали их 24 ч в полной среде DMEM/F-12 с концентрацией глюкозы 5 г/л. Наблюдали усиление относительной экспрессии генов Carbox, Krt18, Krt19 и Cyt1A1 по сравнению с соответствующим контролем. Данный эффект наблюдали во всех вариантах культивирования МСК (рисунок 7).

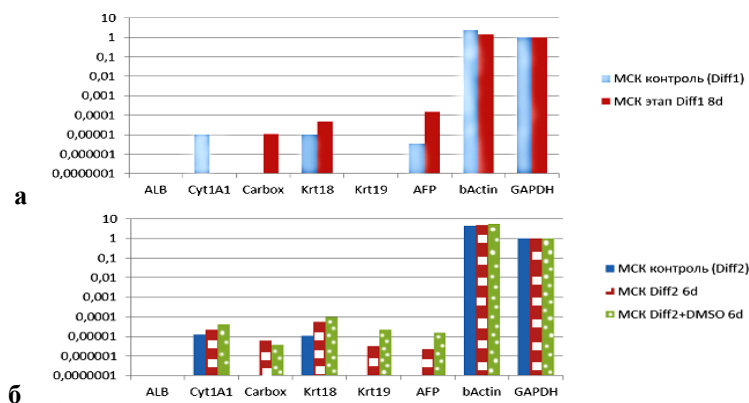


Рисунок 6 — Изменения профиля относительной экспрессии генов в образцах мРНК, изолированных из МСК контрольной культуры (без дифференцировочных факторов) и МСК на 8-е сутки I этапа (а) и на 6-е сутки II этапа (б)

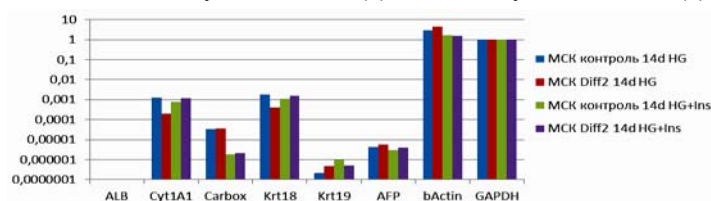


Рисунок 7 — Изменения профиля относительной экспрессии генов в образцах мРНК, изолированных из МСК на 14-е сутки II дифференцировочного этапа после 24 ч инкубации в среде с повышенным уровнем глюкозы

*Первая пара столбцов — контроль и дифференцировка, вторая — то же самое с мембранными вставками и кондиционированием с первичными гепатоцитами

Заключение

Наблюдаемые изменения в профиле экспрессии генов на протяжении этапов дифференцировки свидетельствуют о присутствии в культуре МСК клеток, дифференцированных в гепатоцитарном направлении. Экспрессия генов Carbox, Krt18, Krt19 и Cyt1A1 в большой степени зависит от состава среды, не является постоянной и носит индуцибельный характер. Представляется важным дальнейший поиск молекулярно-генетических маркеров дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении. Полученные результаты демонстрируют необходимость систематизации имеющихся данных об изменениях уровня экспрессии генов при дифференцировке МСК в гепатоциты с целью унификации условий оценки профиля экспрессии генов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Долгих, М. С. Перспективы терапии печеночной недостаточности с помощью стволовых клеток / М. С. Долгих // Биомедицинская химия. — 2008. — Т. 54, Вып. 4. — С. 376–391.

2. Fitzpatrick, E. Human hepatocyte transplantation: state of the art / E. Fitzpatrick, R. R. Mitry, A. Dhawan // J. Intern. Med. — 2009. — Vol. 266. — P. 339–357.

3. Bone marrow stem cells and the liver: are they relevant? / M. A. Eckersley-Maslin [et. al.] // J. Gastroenterol Hepatol. — 2009. — №24. — P. 1608–1616.

4. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone / H. Zhu [et. al.] // Nat Protoc. — 2010. — № 5(3). — P. 550–560.

5. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в гепатоцитоподобные клетки *in vitro* / Я. И. Исайкина [и др.] // Вести Национальной Академии Наук Беларуси. — 2011. — № 1. — С. 10–15.

6. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells / C. Lange [et. al.] // World J. Gastroenterol. — 2006. — № 12. — P. 2394–2397.

7. Seglen, P. O. Preparation of rat liver cells / P. O. Seglen // Methods Cell Biol. — 1976. — № 13. — P. 29–83.

8. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye [et. al.] // BMC Bioinformatics. — 2012. — № 13. — P. 134.

9. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model / K. Langaese [et al.] // BMC Molecular Biology. — 2008. — Vol. 9, № 1. — P. 53.

Поступила 09.07.2013

УДК 617:615.468.2:531.43/46

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРЕНИЯ ПЛЕТЕННЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ НИТЕЙ НА ОСНОВЕ ТРАДИЦИОННОГО ШОВНОГО МАТЕРИАЛА

Д. Н. Бонцевич, М. Л. Каплан

Гомельский государственный медицинский университет

Цель: изучить характеристики трения плетеных хирургических нитей на основе традиционного шовного материала.

Материалы и методы. Изучение трения сухих и мокрых нитей производилось на аппарате «ComTen 94С» по оригинальной разработанной методике. Между захватами в горизонтальном положении крепили цилиндрическую оправку диаметром 40 мм, обернутую лоскутом замшевой кожи. После закрепления конца нити в под-