

ния на $\lambda = 532$ нм. Учитывая вышеприведенный механизм образования МДА можно объяснить данные, представленные в таблице 2 (5 и 6). Результаты данных под номерами 5 и 6, вероятно, и представляют собой ТБК-активный продукт превращения спирта под действием ультразвука. Представленные реакции химического превращения являются предполагаемым механизмом образования малонового диальдегида.

Заключение

В эксперименте получены новые данные об образовании ТБК-активных продуктов из этилового спирта, имеющие поглощение света на длине волны 532 нм, при взаимодействии с АФК, которые возникают в водных растворах под действием ультразвуковых волн. Результаты образования ТБК-активных продуктов подтверждены в эксперименте по защите мембран эритроцитов этанолом от перекисного окисления в ультразвуковом поле и прямым действием ультразвука на растворы этанола. Предложен предполагаемый химический механизм образования ТБК-активного продукта — малонового диальдегида из раствора спирта при взаимодействии с радикалами кислорода в нормальных условиях.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. — М.: Наука, 1972. — 252 с.

2. Маргулис, М. А. Звукохимические реакции и сонолюминесценция / М. А. Маргулис. — М., 1986. — 260 с.

3. Маргулис, М. А. Основы звукохимии / М. А. Маргулис. — М.: Химия, 1984. — 260 с.

4. Freeman, G. R. Radiation chemistry of ethanol: A review of data on yields, reactions rates parameters and spectral properties of transients / G. R. Freeman // NSRDS-NBS, 1974. — № 48. — P. 56.

5. Hart, E. T. A review of the radiation chemistry of the hydrated electron in aqueous solution / E. T. Hart, J. K. Thomas, S. A. Gordon // Radiat. Res. — 1964. — Vol. 21, № 4. — P. 74–87.

6. Anbar, M. A. Selected specific rates of transients from water in aqueous solution. 1. Hydrated electron / M. A. Anbar, M. B. Ross // NSRDS-NBS, 1973. — № 43. — P. 1–59.

7. Петряев, Е. П. Радиационная химия бифункциональных органических соединений / Е. П. Петряев, О. И. Шадьро. — Минск: Унисерситетское, 1986. — 168 с.

8. Adams, G. E. Pulse radiolysis studies on the oxidation of organic radicals in aqueous solution / G. E. Adams, R. L. Willson // Trans. Faraday Soc. — 1969. — Vol. 65, № 9. — P. 2981–2987.

9. Маргулис, М. А. О механизме многопузырьковой сонолюминесценции / М. А. Маргулис // Журнал физической химии. — 2006. — Т. 80, № 10. — С. 1908–1913.

10. Химия и ультразвук / под ред. А. С. Козьмина. — М.: Мир, 1993. — С. 560.

11. Хенох, М. А. Действие криолиза и ультразвуковых колебаний на растворы актомиозин / М. А. Хенох, Г. П. Пинаев, Е. А. Ковалева // Реакция клеток на экстремальное воздействие. — М.: Изд. АН СССР, 1963. — С. 6–13.

12. Kowalski, H. Biofizyczne efekty oddziaływania polaultradźwiękowego na erytrocyty krwi obwodowej / H. Kowalski // Pol. prz. radiol. — 1986. — Vol. 50, № 3. — P. 147–154.

13. Chatter, S. N. Membrane lipid peroxidation and its pathological consequences / S. N. Chatter, S. Agarwal, A. Kumarjana // Indian J. Biochem and Biophys. — 1988. — Vol. 25, № 1–2. — P. 25–31.

14. Kumat, J. A. Ultrasonic radiation induced lipid peroxidation in liposomal membrane / J. A. Kumat // Radiat. arid Environ. Biophys. — 1986. — Vol. 25, № 4. — P. 303–314.

Поступила 02.08.2012

УДК 616.1.9-055.5

ИЗУЧЕНИЕ МИГРАЦИИ ЭКЗОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А. Г. Скуратов, Д. Р. Петренев, А. Н. Кондрачук, С. Л. Ачинович, Б. Б. Осипов

Гомельский государственный медицинский университет
Гомельский областной клинический онкологический диспансер

Цель исследования: изучить миграцию мезенхимальных стволовых клеток, введенных в организм лабораторных животных с индуцированным токсическим гепатитом.

Материалы и методы: лабораторные крысы линии Вистар; СС₁-индуцированный токсический гепатит; мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани (выделение, культивирование и окраска флуоресцентным красителем РКН 67); введение меченных мезенхимальных стволовых клеток в организм крыс; флуоресцентная микроскопия криосрезов органов.

Результаты: Анализируя изображения флуоресцентной микроскопии органов крыс, было отмечено присутствие очагов яркой желто-зеленой флуоресценции размером с клетку (предположительно меченных мезенхимальных стволовых клеток) на фоне аутофлуоресценции цитоплазмы клеток зеленоватого цвета и красной флуоресценции ядер. Было выявлено, что распространенность этих очагов по различным органам отличалась. Наибольшая плотность очагов была отмечена в селезенке и в печени при хроническом гепатите. В почках, миокарде, легких в редких случаях отмечались единичные очаги яркой флуоресценции и случаи сомнительно-позитивных элементов.

Заключение: При внутривенном введении меченных мезенхимальных стволовых клеток обнаружены очаги специфической флуоресценции в селезенке у здоровых и больных животных и в печени у крыс с хроническим гепатитом. Это может свидетельствовать о тропности МСК к селезенке и поврежденной печени. Наблюдалась тенденция к увеличению концентрации очагов от 1-х к 5-м суткам наблюдения.

Ключевые слова: крысы линии Вистар, СС₁-модель хронического гепатита, мезенхимальные стволовые клетки, флуоресцентная микроскопия.

STUDY OF EXOGENOUS MESENCHYMAL STEM CELL MIGRATION AT EXPERIMENT

A. G. Skuratov, D. R. Petreniov, A. N. Kondrachuk, S. L. Achinovich, B. B. Osipov

Gomel State Medical University
Gomel Regional Clinical Oncologic Dispensary

Objective: to study the migration of mesenchymal stem cells introduced into the body of laboratory animals with induced toxic hepatitis.

Materials and Methods: Wistar laboratory rats; CCl₄-induced toxic hepatitis, mesenchymal stem cells from adipose tissue (isolation, cultivation and coloring by fluorescence PKH 67), the introduction of mesenchymal stem cells in rats, fluorescent microscopy of the organ cryo- images.

Results: The analysis of the rats' fluorescence microscopy images revealed the presence of bright yellow-green cell size fluorescence foci (presumably of marked mesenchymal stem cells) caused by greenish cytoplasm autofluorescence and red nucleus fluorescence. It was found that the prevalence of these foci in various organs was differed. The highest density of the foci was observed in spleen and liver in chronic hepatitis. In kidneys, myocardium, lungs, in rare cases, there were isolated foci of bright fluorescence and cases of doubtfully positive cells.

Conclusion: The intravenous administration of marked mesenchymal stem cells revealed specific fluorescent foci in the spleen of both the healthy and sick animals and in the liver of the rats with chronic hepatitis. This may be indicative of MSC's tropism to spleen and injured liver. There was a trend to increase the concentration of the foci from the first to the fifth day of observation.

Key words: Wistar rats, CCl₄-model of chronic hepatitis, mesenchymal stem cells, fluorescent microscopy.

Введение

В последние годы внимание ученых во всем мире направлено на изучение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и их влияние на репаративные процессы в поврежденных органах и тканях организма [2, 3, 6, 12, 13, 14, 15]. Проблема лечения цирроза печени, развивающегося на фоне хронического гепатита (ХГ), сохраняет свою актуальность, несмотря на разработку и внедрение новых способов лечения [7, 8]. Единственным эффективным вариантом является трансплантация печени, применение которой лимитировано нехваткой донорских органов и высокими материальными затратами. Применение клеточной трансплантации с использованием мезенхимальных стволовых клеток может стать альтернативой органной трансплантации или «мостом» к ней для пациентов, находящихся в листе ожидания [1, 5]. Однако существует множество неисследованных и спорных вопросов, касающихся эффективности применения экзогенных МСК при ХГ [9, 10, 11].

Цель исследования

Изучить миграцию мезенхимальных стволовых клеток, введенных в организм лабораторных животных с индуцированным токсическим гепатитом.

Материалы и методы

Использовались лабораторные крысы линии Вистар (ядро F, самцы, масса тела 180-200 граммов). Выделение и культивирование МСК из жировой ткани крыс проводили по стандартной методике [11]. Для экспериментов использовали МСК второго пассажа.

Моделирование токсического гепатита проводили путем внутрибрюшинного введения 50 % раствора ССl₄ (четырёххлористый углерод, тетрачлорметан) на оливковом масле из расчета 1 мл на кг массы тела 2 раза в неделю. Для потенцирования развития цирроза печени вместо питьевой воды давали 5 % раствор этилового спирта.

Для изучения миграционной активности МСК после их трансплантации в организм лабораторных животных производили окрашивание МСК с помощью флуоресцентного красителя РКН 67 с эмиссией 502 нм (Sigma, Германия) (рисунок 1).

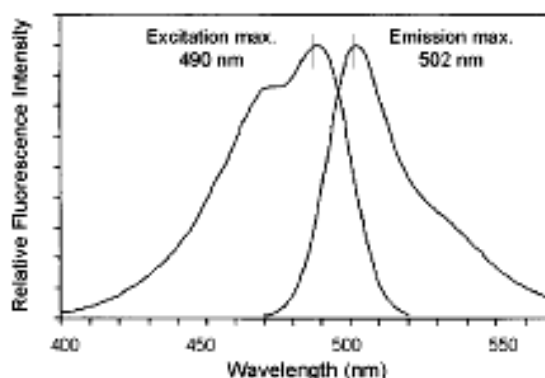


Рисунок 1 — Флуоресцентные характеристики РКН 67

Степень окрашивания МСК оценивали методом проточной цитометрии (прибор FC-500 «Beckman Coulter», США). Процент РКН-позитивных клеток составил 96 % (рисунок 2). Для контраста дополнительно производили окраску ядер клеток

пропидий йодидом (PI), дающим красное свечение. Для трансплантации лабораторным животным окрашенные РКН 67 МСК ресуспендировали в D-PBS и вводили в концентрации $0,5-1 \times 10^6$ клеток/мл на сайт введения на животное.

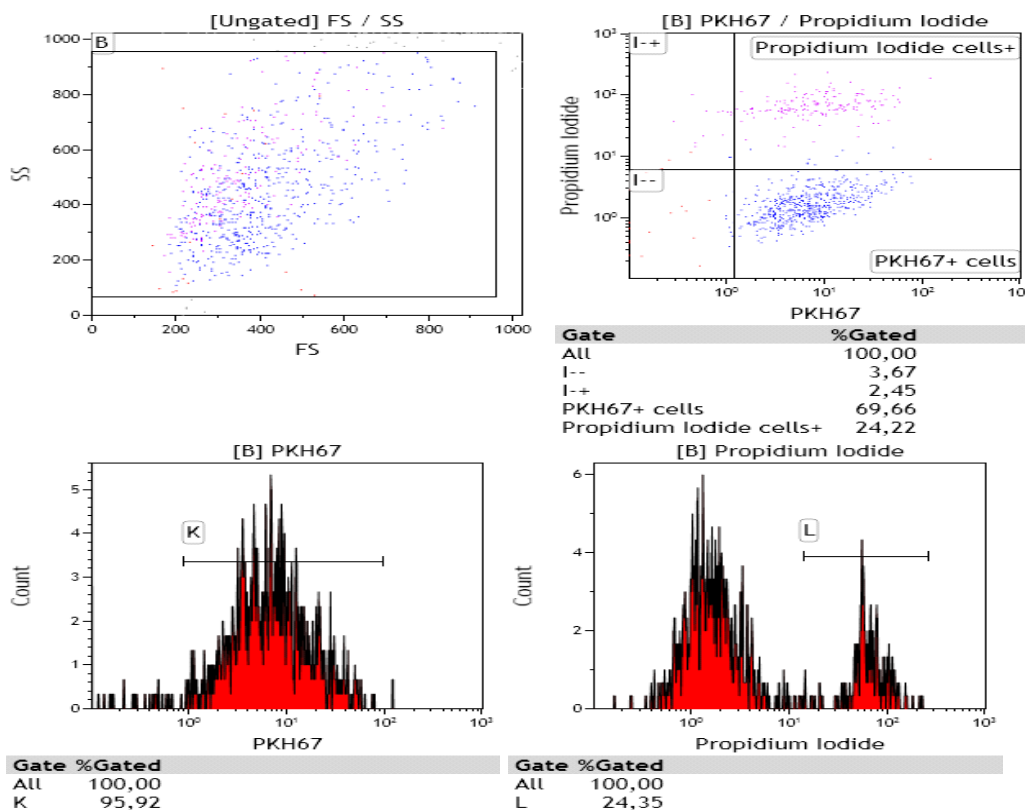


Рисунок 2 — Проточная цитометрия МСК, меченных РКН 67 и PI

Методика введения суспензии МСК в хвостовую вену крысы

Производили согревание задней части туловища и хвоста под настольной лампой в течение 2 минут. Под кратковременным ингаляционным эфирным наркозом в положении крысы на животе обрабатывали ее хвост антисептиком («Септоцид»). У основания хвоста накладывали резиновый жгут. Пункцию боковой (правой или левой) хвостовой вены про-

изводили на границе средней и дистальной трети хвоста с помощью инсулиновой иглы (контроль нахождения иглы в вене по поступлению крови в шприц) и медленно вводили взвесь МСК, предварительно сняв резиновый жгут. Концентрация МСК во взвеси составляла 2×10^6 в мл, объем введенной взвеси — 0,5 мл. После извлечения иглы при необходимости производили остановку кровотечения из места укола прижатием на 3–5 минут (рисунок 3).



Рисунок 3 — Введение МСК в хвостовую вену

Животных выводили из эксперимента через 1 и 5 суток. Из органов животных (печень, селезенка, легкое, почка, сердце) изготавливали криосрезы, изучали их на флуоресцентном микроскопе NIKON Eclipse E200.

Результаты и обсуждение

Через 2 месяца назначения тетрахлорметана у крыс развилась картина хронического токсического гепатита с переходом в цирроз (рисунок 4).

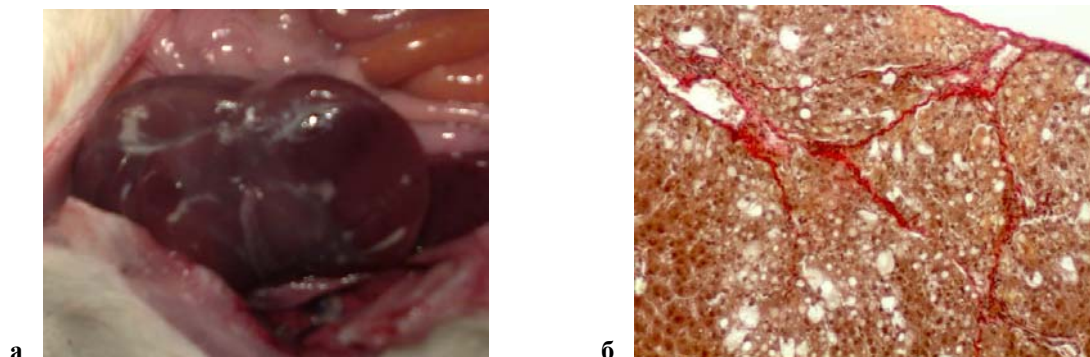


Рисунок 4 — Макрокартина токсического хронического гепатита крысы (а); ткань печени крысы при постнекротическом циррозе (б): формирование мультилобулярных ложных долек, разделенных полями соединительной ткани, перипортальный и центрлобулярный фиброз, жировая дистрофия гепатоцитов. $\times 100$. Окраска по Ван-Гизон

Флуоресцентная микроскопия криопрепаратов

Печень здоровой крысы. Гепатоциты относительно однородные, многогранные и реже — округлой формы с четкими контурами, хорошо выраженной цитоплазмой и округлыми несколько эксцентрически расположенными интенсивно окрашенными ядрами. Крупные ядра и двуядерные клетки встречаются в 7 % случаев. Ядра флуоресцируют красным цветом, цитоплазма клеток — зеленым. Специфическая флуоресценция МСК не определяется.

Селезенка здоровой крысы. Вокруг центральных артерий определяются лимфоидные фолликулы, умеренно выраженные с наличием лимфоидных клеток разной степени зрелости.

Ядра лимфоцитов округлые с интенсивной люминесценцией красного цвета. Цитоплазма слабо выраженная с зеленоватым свечением. Ретикулярные клетки в красном фильтре люминесцируют зеленоватым цветом. Яркие очаги флуоресценции (предположительно, меченные МСК) определяются вокруг центральной артерии в фолликулах белой пульпы до 16 клеток в одном фолликуле (48 МСК в одном поле зрения $\times 100$). Фолликул селезенки представлен клетками лимфоидного ряда разной степени зрелости, ядра крупные, округлые, люминесцируют красным цветом. Цитоплазма выражена слабо, люминесцирует зеленым цветом. МСК до 16 в одном поле зрения $\times 400$ (рисунок 5).

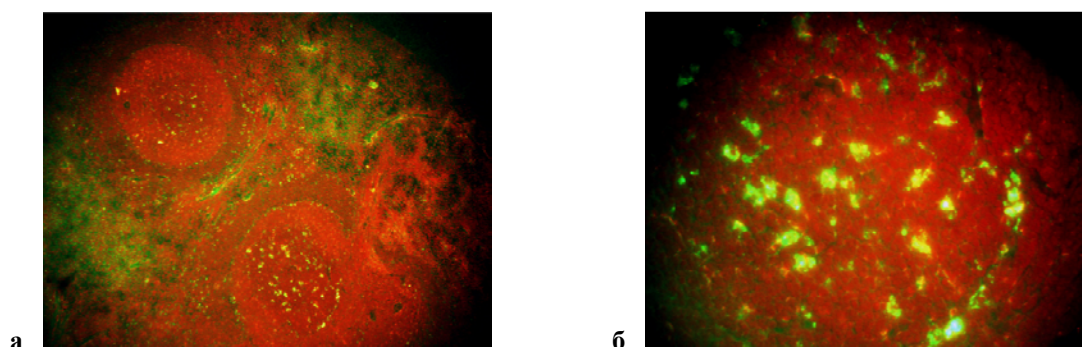


Рисунок 5 — Флуоресцентная микроскопия криопрепарата селезенки здоровой крысы на 5 сутки (объектив $\times 10$ (а), $\times 40$ (б))

МСК определяются вокруг центральной артерии в фолликулах белой пульпы до 82 клеток в одном фолликуле, в красной пульпе — 65 (147 МСК в одном поле зрения $\times 100$). Фолликул селезенки представлен клетками лимфоид-

ного ряда разной степени зрелости, ядра крупные, округлые, люминесцируют красным цветом. Цитоплазма выражена слабо, люминесцирует зеленым цветом. МСК до 41 в одном поле зрения ($\times 400$).

Крысы с хроническим тетрахлорметановым гепатитом

Печень. Гепатоциты относительно однородные, многогранные и реже — округлой формы с четкими контурами, хорошо выраженной цитоплазмой и округлыми несколько эксцентрически

расположенными интенсивно окрашенными ядрами. Крупные ядра и двуядерные клетки встречаются в 7 % случаев. Ядра люминесцируют красным цветом, цитоплазма клеток — зеленым. Определяются до 17 МСК, преимущественно, вокруг портальных трактов (рисунок 6).

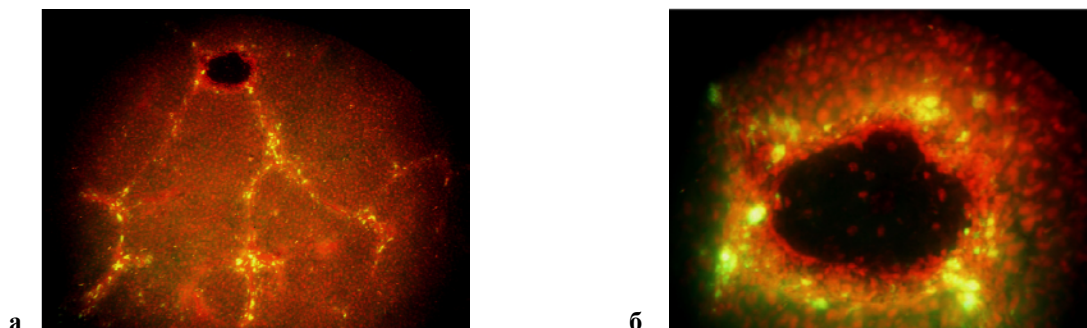


Рисунок 6 — Флуоресцентная микроскопия криопрепарата печени крысы с ХГ на 5 сутки (объектив $\times 10$ (а), $\times 40$ (б))

Гепатоциты многогранные, кубической и призматической, местами разной величины и формы. До 11 % клеток имеют более крупные ядра и встречаются двуядерные клетки. Цитоплазма хорошо развита, ядрышки маленькие: 1–2. Цитоплазма люминесцирует зеленым цветом, ядра красные. Определяется 107 МСК (в поле зрения $\times 100$), 39 МСК (в поле зрения $\times 400$) с преимущественной локализацией по ходу портальных трактов, местами диффузно проникают в дольки.

Селезенка. Вокруг центральных артерий определяются лимфоидные фолликулы, умеренно выраженные с наличием лимфоидных клеток разной степени зрелости. Ядра лимфоцитов округлые

с интенсивной люминесценцией красного цвета. Цитоплазма слабо выраженная с зеленоватым свечением. Ретикулярные клетки в красном фильтре люминесцируют зеленоватым цветом. МСК определяются вокруг центральной артерии в фолликулах белой пульпы до 22 (1 сутки) и до 54 (5 сутки) клеток в одном фолликуле, 20 клеток в красной пульпе (42 (1 сутки), 250 (5 сутки) МСК в одном поле зрения $\times 100$). Фолликул селезенки представлен клетками лимфоидного ряда разной степени зрелости, ядра крупные, округлые, люминесцируют красным цветом. Цитоплазма выражена слабо, люминесцирует зеленым цветом. МСК до 24 (74) в одном поле зрения $\times 400$ (рисунок 7).

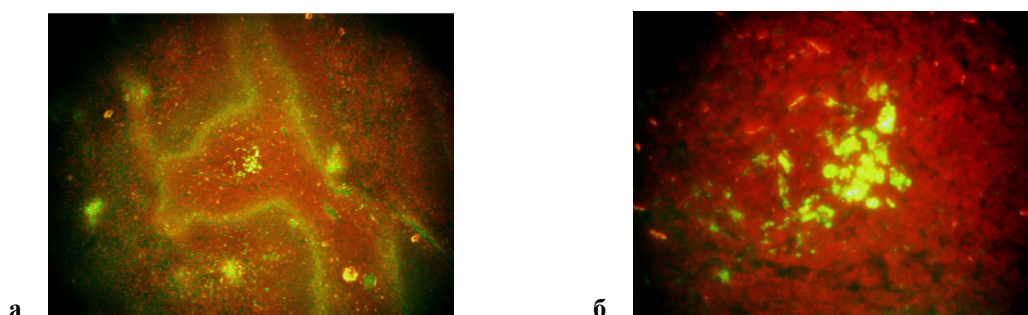


Рисунок 7 — Флуоресцентная микроскопия криопрепарата селезенки крысы с ХГ на 5 сутки (объектив $\times 10$ (а), $\times 40$ (б))

В других органах (почки, миокард, легкие) специфической флуоресценции МСК выявлено не было.

Заключение

При анализе изображения флуоресцентной микроскопии органов крыс, было отмечено присутствие очагов яркой желто-зеленой флуоресценции размером с клетку (предположительно меченных РКН67 МСК) на фоне аутофлуоресценции цитоплазмы клеток зеле-

новатого цвета и красной флуоресценции ядер (PI). Было выявлено, что распространенность этих очагов по различным органам отличалась. Наибольшая плотность очагов была отмечена в селезенке и в печени при хроническом гепатите. В почках, миокарде, легких в редких случаях отмечались единичные очаги яркой флуоресценции и случаи сомнительно-положительных элементов.

Так как при внутривенном введении меченных МСК были обнаружены очаги специфической флуоресценции в селезенке у здоровых и больных животных и в печени у крыс с ХГ, то это может свидетельствовать о тропности МСК к селезенке и поврежденной печени. Наблюдалась тенденция к увеличению плотности очагов от 1 к 5 суткам наблюдения.

Следует продолжить исследования, подтверждающие специфичность флуоресценции в органах и присутствие в них МСК, а также дальнейшую миграционную активность МСК.

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. Кирик, В. М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине / В. М. Кирик, Г. М. Бутенко // Журн. АМН України. — 2010. — Т. 16, № 4. — С. 576–604.
3. Яргин, С. В. Стволовые клетки и клеточная терапия: на подступах к научному подходу / С. В. Яргин // Цитология. — 2010, Т. 52, № 11. — С. 918–920.
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. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes / A. Banas [et al.] // Hepatology. — 2007. — Vol. 46. — P. 219–228.
6. Barry, F. P. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / F. P. Barry, J. M. Murphy // Int J. Biochem Cell Biol. — 2004. — № 36(4). — P. 568–584.
7. Dan, Y. Y. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective / Y. Y. Dan, G. C. Yeoh // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2008. — № 23. — P. 687–698.
8. Fausto, N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells / N. Fausto // Hepatology. — 2004. — № 39. — P. 1477–1487.
9. Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver / T. G. Fellous [et al.] // Hepatology. — 2009. — № 49. — P. 1655–1663.
10. 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.
11. Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking / P. K. Horan [et al.] // Methods in Cell Biology. — 1990. — Vol. 33. — P. 469.
12. Gokhale, P. J. A prospective on stem cell research / P. J. Gokhale, P. W. Andrews // Semin Reprod Med. — 2006. — Vol. 24(5). — P. 289–297.
13. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk [et al.] // Mol Biol Cell. — 2002. — Vol. 13(12). — P. 4279–4295.
14. Meirelles, Lda S. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells / Lda. S. Meirelles, N. B. Nardi // Front Biosci. — 2009. — Vol. 14. — P. 4281–4298.
15. Meirelles, Lda S. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells / A. I. Caplan, N. B. Nardi // Stem Cells. — 2008. — Vol. 26(9). — P. 2287–2299.

Поступила 09.11.2012

ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ, ГИГИЕНА

УДК 615.9: [628/52 6 661/727.1]

ИССЛЕДОВАНИЯ СТРОИТЕЛЬНО-ИНТЕРЬЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ПОЛИМЕРНОЙ ОСНОВЕ В АГГРАВИРОВАННЫХ УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ

В. М. Василькевич, Л. В. Половинкин

Республиканский научно-практический центр гигиены, г. Минск

Проведены санитарно-химические исследования с целью экспериментального установления агgravированных условий моделирования строительно-интерьерных полимерных материалов, позволяющих ускорить проведение их гигиенической оценки, а также выявить индикаторные (приоритетные) загрязнители воздуха помещений, мигрирующие из полимерных материалов. Для исследований в климатической камере объемом 0,12 м³ были взяты 54 образца основных видов полимерных материалов. В результате проведенных исследований экспериментально установлены агgravированные условия моделирования полимерных материалов (температура 50 ± 2 °С; относительная влажность 60 ± 5 %), позволяющие увеличить степень эмиссии индикаторных веществ, мигрирующих из них, и сократить в 3 раза экспозиционное время по сравнению со стандартными условиями. Также установлен перечень мигрирующих из полимерных материалов индикаторных веществ, который зависит от вида полимерной основы.

Ключевые слова: полимерные материалы, агgravированные условия, индикаторные вещества.

STUDIES OF CONSTRUCTION AND INTERIOR POLYMER-BASED MATERIALS IN AGGRAVATED MODELING CONDITIONS

V. M. Vasilkevich, L. V. Polovinkin

Republican Research Center for Hygiene, Minsk

To determine the experimental aggravated conditions for modeling construction and interior design of polymeric materials making it possible to expedite their hygienic assessment and to identify indicator (priority) indoor air contaminants migrating from polymeric materials, the sanitary-chemical studies have been conducted. 54 samples of basic