

КРИСТАЛЛОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь
Кафедра биологии, кафедра биохимии с курсом КЛД ФПДО*

Ключевые слова: культуры клеток *in vitro*, кондиционированные среды, кристалломорфологический анализ.

Резюме. Проведен сравнительный анализ кристалломорфологических картин кондиционированных сред, полученных при культивировании разных типов клеток. Показано, что изменение химического состава кондиционированной среды по мере культивирования клеток отражается на габитусе растущих кристаллов, что дает основание использовать кристалломорфологический подход для разработки метода оценки качества кондиционированных сред.

Resume. A comparative analysis of cristallomorfological paintings of conditioned media of different origin. Changing in the chemical composition of the conditioned medium affects the morphology of the crystals. The method can be used to assess the quality of the conditioned media.

Актуальность. В последнее десятилетие кондиционированные среды (КС), т.е. питательные среды, содержащие продукты жизнедеятельности предварительно культивированных в них клеток, привлекают все большее внимание в качестве потенциальных лекарственных средств для регенеративной медицины [4-6]. Однако из-за чрезвычайно низкой концентрации целевых биологически активных веществ, существует настоятельная необходимость разработки новых подходов для оценки качества КС. Одним из возможных способов комплексной характеристики среды может стать кристалломорфологический метод, основанный на анализе различий количества и формы кристаллов, в зависимости от присутствия в ней разнообразных метаболитов и биологически активных веществ. Метод уже хорошо зарекомендовал себя в диагностике разнообразных болезней [1-3].

Цель исследования: сравнительный анализ кристалломорфологических картин кондиционированных сред, полученных при культивировании разных типов клеток.

Материалы и методы. В работе использовали постоянные линии преадипоцитов 3T3-L1 и гепатоцитов HEPG2, а также первичную культуру адипоцитов, выделенных из подкожной жировой ткани крыс [7]. Клетки выращивали на питательных средах DMEM, RPMI-1640 или DMEM/F12, соответственно, с добавлением антибиотиков и 10 % фетальной телячьей сыворотки. Кондиционированную среду отделяли от клеток центрифугированием. Среда кристаллизовала, добавляя для инициации процесса спиртовой раствор нингидрина [2, 3]. При последующем микроскопировании оценивали количество, форму и размер образовавшихся кристаллов.

Результаты и их обсуждение. Кристалломорфологическая картина свежей питательной среды DMEM/F12 представлена крупными полусферолитами с прозрачными тонкими лучами неправильной формы в виде пластинок слюды (рис. 1А). Между лучами располагались гранные формы кристал-

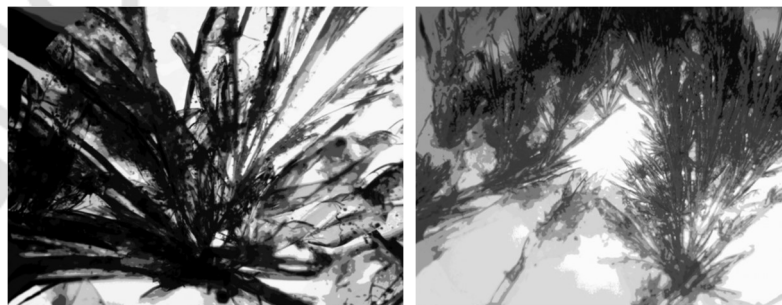
лов со ступеньками роста второй фазы в центре кристалла. В КС, полученной после 3-х дневного культивирования первичных адипоцитов, кристаллы росли в общей форме полусферолитов (рис. 1Б). Косо изогнутые лучи исходили по 6-7 из центра кристаллизации, образуя ветви второго порядка. Боковые грани лучей имели сложную форму в виде тонких прозрачных пластинок, расположенных под углом 30° . В КС, полученной после 7-ми дневного культивирования клеток, кристаллы также имели форму полусферолитов, но с игловидными переплетающимися лучами первого, второго и третьего порядка разной длины (рис. 1В).

Кристалломорфологическая картина свежей среды RPMI-1640 представлена четко сформированной сетью дендритов с ветвями 3-4 порядков (рис. 2А). В КС, полученной после 3-х дневного культивирования гепатоцитов HEPG2, преобладающими были правильные сферолиты (рис. 2Б). При более длительном культивировании клеток в габитусе происходила замена на полусферолиты с деформированными лучами (рис. 2В).

Полная среда DMEM в отличие от среды DMEM/F12 демонстрировала склонность к формированию дендритных образований (рис. 3А). В КС, полученной от контаминированной микоплазмой культуры преадипоцитов 3T3-L1, обнаруживались преимущественно дендриты с гранными формами (рис. 3Б). В кристалломорфологической картине КС от контаминированной культуры, прошедшей обработку антибиотиком, преобладали неразросшиеся ставролиты (рис. 3Б).



А

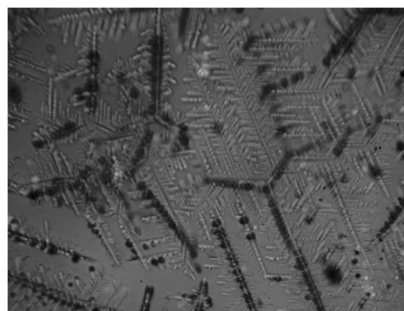


Б

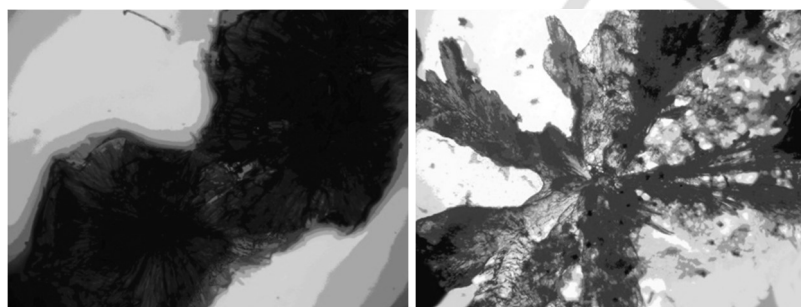
В

Рис. 1 Кристалломорфологическая картина кондиционированной среды после культивирования первичных адипоцитов: А – свежеприготовленная

среда DMEM/F12; Б – 3 дня культивирования адипоцитов; В – 7 дней культивирования адипоцитов.



А

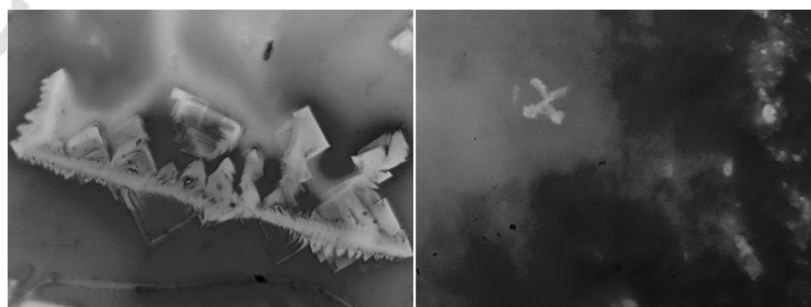


Б В

Рис. 2 Кристалломорфологическая картина кондиционированной среды после культивирования гепатоцитов линии: А – свежеприготовленная среда RPMI-1640; Б – 3 дня культивирования гепатоцитов; В – 7 дней культивирования гепатоцитов.



А



Б В

Рис. 3 Кристалломорфологическая картина кондиционированной среды после культивирования преадипоцитов 3T3-L1, контаминированных микоплазмой: А – свежеприготовленная среда DMEM; Б – контаминированная культура; В – контаминированная культура, обработанная антибиотиком.

Выводы. Изменение химического состава кондиционированной среды по мере культивирования клеток отражается на габитусе растущих кристаллов, что дает основание использовать кристалломорфологический подход для разработки метода оценки качества кондиционированных сред.

Литература

1. Андюшкин А.И., Сапожников С.П., Карпунина А.В. Кристаллография биологических жидкостей (обзор литературы) // Вестник ЧГУ. – 2013. – №3. – С. 355–359.
2. Смирнов Ю.М., Курбатова Л.А. Кристалломорфологический метод диагностики стадий варикозной болезни вен нижних конечностей // Вестник ТвГУ. Серия: Физика. – 2009. – № 3 (4). – С. 35–37.
3. Смирнов Ю.М., Курбатова Л.А., Павлова Н.В. и др. Применение кристалломорфологического метода при диагностике некоторых заболеваний нервной системы // Вестник ТвГУ. Серия: Физика. – 2010. – № 9. – С. 25–30.
4. Bhang S.H., Lee S., Shin J.Y. et. all. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis // Mol. Ther. – 2014. – V. 22 (4). – P. 862–872.
5. Chen L., Xu Y., Zhao J. et. all. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice // PLoS One. – 2014. – V. 9 (4). – doi: 10.1371/journal.pone.0096161.
6. Pawitan J.A. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine // Biomed Res Int. – 2014. – doi: 10.1155/2014/965849.
7. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et. all. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // Molecular Biology of the Cell. – 2002. – V. 13. – P. 4279–4295.