МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИБРОБЛАСТОВ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ McCoy ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ПРЕПАРАТАМИ МАГНИЯ

Л.В. Диденко¹, Т.Г. Боровая¹, Е.А. Кост¹, Е.А. Улубиева^{2*},
А.В. Тимофеева², А.Г. Автандилов²

¹ Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи. 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

² Российская медицинская академия последиplomного образования
239955, Москва, ул. Баррикадная, 2/11

Цель. Изучить влияние магния оротата, магния в комбинации с пиридоксином, сульфата магния на морфофункциональные характеристики фибробластов клеточной культуры фибробластов линии McCoy.

Материал и методы. Методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии было проведено исследование культуры фибробластов клеточной линии McCoy при добавлении в среду культивирования магнийсодержащих препаратов (магния оротата, магния в комбинации с пиридоксином, сульфата магния).

Результаты. При введении в среду оротата магния, а также магния в комбинации с витамином B6 возникали выраженные изменения морфофункционального статуса фибробластов, отсутствовавшие при введении сульфата магния. При этом фибробласты существенно активизировали синтетическую и секреторную деятельность, что выражалось в образовании в клеточном пласте хорошо сформированного аморфного и волокнистого компонентов.

Заключение. Проведенный сравнительный морфологический анализ действия магния оротата, магния в комбинации с витамином B6, магния сульфата на морфофункциональную организацию фибробластов показал стимуляцию ионами магния пролиферативной активности ФБ. Выявлено преимущественное влияние магния оротата, и менее выраженное влияние магния в комбинации с витамином B6 на биосинтетические процессы в клетках, включая синтез аморфного и волокнистого компонентов (протоколлагена и эластина) экстрацеллюлярного матрикса.

Ключевые слова: электронная микроскопия, фибробласты, оротат магния, пиридоксин, сульфат магния.

Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2015;11(2):170–176

Morphofunctional characteristics of fibroblasts (McCoy cell line) cultured with magnesium preparations

L.V. Didenko¹, T.G. Borovaya¹, E.A. Kost¹, E.A. Ulubieva^{2*}, A.V. Timofeeva², A.G. Avtandilov²

¹ Gamalei' Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology. Gamalei ul. 18, Moscow, 123098 Russia

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education. Barrikadnaya ul. 2/1, Moscow, 123995 Russia

Aim. To study the effect of magnesium orotate, magnesium/pyridoxine combination and magnesium sulfate on fibroblast morphofunctional characteristics in cell culture of fibroblasts (McCoy line).

Material and methods. The study of fibroblasts (McCoy line) with the addition of magnesium-containing preparations (magnesium orotate, magnesium/pyridoxine combination, magnesium sulphate) to the culture medium was performed using scanning and transmission electron microscopy.

Results. When adding into the media magnesium orotate or magnesium/pyridoxine combination, significant changes in morphofunctional state of fibroblasts were noted, which were absent when adding magnesium sulfate. At that fibroblasts significantly promoted synthetic and secretory activity. This was expressed in the formation of amorphous and fibrous components in well-formed cell layers.

Conclusion. Stimulation by magnesium ions of the proliferative activity of fibroblasts is shown in the morphological analysis of the effect of magnesium orotate or magnesium in combination with pyridoxine and magnesium sulfate on morphological and functional organization of fibroblasts. Revealed the predominant influence of magnesium orotate, and a less pronounced effect of magnesium in combination with pyridoxine on biosynthetic processes in the cells, including the synthesis of amorphous and fibrous components (protocollagen and elastin) of the extracellular matrix founded.

Key words: electron microscopy, fibroblasts, magnesium orotate, pyridoxine, magnesium sulfate.

Ration Pharmacother Cardiol 2015;11(2):170–176

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): elena.ulubieva@yandex.ru

Фибробласты являются основным структурным компонентом рыхлой волокнистой соединительной ткани, которая входит в состав всех органов организма человека и выполняет опорно-трофическую и регуляторную функции. Свойства этой полидифференной

ткани в значительной мере определяются структурно-функциональным статусом клеток фибробластического ряда [1].

В этой связи характер морфофункциональных изменений фибробластов при действии лекарственных препаратов в условиях культивирования *in vitro* может в определенной степени отражать реакцию ткани в целом и быть полезным для понимания и интерпретации результатов воздействия на ткани (и органы) различных лекарственных препаратов.

Препараты магния рассматриваются как биологически активные вещества, влияющие на клеточный метаболизм, в том числе, метаболизм и физиологию фибробластов [2–5]. Ионы магния являются кофактором киназ, участвуют в стабилизации молекулы АТФ и нейтрализации отрицательного заряда субстрата, обес-

Сведения об авторах

Диденко Любовь Васильевна – д.м.н., зав. лабораторией
ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи

Боровая Татьяна Геннадьевна – д.м.н., член-корр. РАН,
профессор, г.н.с. того же центра

Кост Елена Андреевна – к.б.н., м.н.с. того же центра

Улубиева Елена Арсеновна – к.м.н., доцент кафедры
терапии и подростковой медицины РМАПО

Тимофеева Анна Вячеславовна – к.м.н., доцент
той же кафедры

Автандилов Александр Георгиевич – д.м.н., профессор,
заведующий той же кафедрой

печивая присоединение АТФ к активному центру фермента [6,7]. В предыдущем исследовании нами было выявлено позитивное влияние лекарственного препарата магния оротата на показатели гемодинамики и структурное состояние рыхлой волокнистой соединительной ткани у больных с пролапсом митрального клапана и признаками недифференцированной дисплазии соединительной ткани [8]. Указанный эффект был связан с достоверным увеличением объема аморфной части матрикса с улучшением его диффузионных способностей, а также с изменением архитектоники соединительной ткани, за счет чего возрастала ее эластичность и растяжимость, что, в конечном итоге, приводило к увеличению внутрижелудочковых объемов и улучшению диастолической функции левого желудочка [8].

Целью данного исследования явилось изучение действия нескольких магнийсодержащих лекарственных препаратов на морфофункциональные характеристики клеточной фибробластов культуры линии McCoy.

Материал и методы

В работе использовали клеточную линию McCoy (гибридная линия синовиальных клеток человека и мышечных фибробластов).

Культуру клеток выращивали на покровных стеклах по стандартной методике в течение 48 час при температуре 37°C [9]. Контрольные фибробласты были выращены в среде Хенкса, в состав которой входит магния сульфат 200 мг/л. В инкубационные среды опытных образцов фибробластов были добавлены: по 10 мкл магния оротата (Магнерот; 3,3 г/л), магния в комбинации с пиридоксином (Магне В₆; 4,8 г/л), 25% магния сульфата (5г/л) из расчета максимальных суточных терапевтических дозировок этих препаратов на кг/веса при назначении их пациентам. При этом учитывалось содержание ионов магния в конечном рабочем растворе (табл. 1).

Препараты фибробластов после инкубации с препаратами магния трижды были отмыты дистиллированной водой, фиксированы парами 2% водного раствора глутаральдегида в течение 30 мин. После фиксации образцы были напылены золотом (999) в напылительной установке SPI-Module Sputter/Carbon Coater System (SPI Inc., USA) и проанализированы в сканирующем электронно-ионном микроскопе Quanta 200 3D в режиме высокого вакуума при инструмен-

тальных увеличениях $\times 500$, $\times 1000$, $\times 1600$, $\times 2000$, $\times 4000$.

Ультраструктурная организация фибробластов была изучена с помощью метода ультратонких срезов в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 100B (Япония). Для этого исследования клетки были выращены на 6-луночных планшетах, удалены с поверхности раствором «Трипсина-Версена» и осажжены центрифугированием в круглодонных пробирках в течение 10 мин при 1500 об/мин. Фиксация клеток проводилась по методу Ito-Karnovsky с дополнительной фиксацией четырехокисью осмия и уранилацетатом, далее препараты были дегидратированы в этаноле (50°, 70°, 96° и 100°) и заключены в метакрилатную смолу LR White по стандартной методике. Ультратонкие срезы были получены с помощью ультратома LKB-3, и контрастированы по методу Рейнольдса.

Результаты

При анализе контрольных препаратов в сканирующем электронно-ионном микроскопе Quanta 200 3D в режиме высокого вакуума фибробласты равномерно покрывали поверхность стекла. В центре образцов расположение фибробластов было достаточно плотным, на периферии – более свободным. Фибробласты имели округлую, веретеновидную или полигональную форму и гладкую или складчатую поверхность, округлые ядра клеток выступали над поверхностью клеточного пласта. У веретеновидных и полигональных клеток отростки были значительно более длинными по сравнению с таковыми у фибробластов округлой формы. На поверхности отдельных фибробластов присутствовали инвагинации, которые являются признаком экзо- или эндоцитозного транспорта. Промежутки между фибробластами были заняты умеренным количеством экстрацеллюлярного матрикса (ЭМ) с многочисленными тонкими волокнами. ЭМ также был хорошо виден на периферии клеточного пласта (непосредственно на поверхности стекла) в виде тонкой аморфной пленки с включениями гранулярного компонента (рис. 1, 2).

При ультраструктурном анализе у фибробластов выявлялись отростки, ядерный хроматин был деконденсирован, в ядрах фибробластов присутствовали одно или два ядрышка, в цитоплазме определялись рибосомы и другие органеллы, участвующие в биосинтетических процессах (рис. 3).

Таблица 1. Содержание ионов магния в конечном рабочем растворе

Рабочие растворы	Среда Хенкса	Магния оротат	Комбинация магния с пиридоксином	Магния сульфат
Исходное содержание Mg^{2+} , г	0,06	0,005	0,087	1,82
Содержание Mg^{2+} в конечном растворе (со средой Хенкса), г	0,06	0,065	0,147	1,88

Рисунок 1. Контрольная культура фибробластов

Фб – фибробласт; ЭМ – экстрацеллюлярный матрикс; В – волокна; О – отростки; О Фб – овальные фибробласты; В Фб – веретенообразные фибробласты; ГЭМ – гранулярный компонент экстрацеллюлярного матрикса; ПФ = протофибриллы; округлые углубления выделены эллипсами. Шкала bar 5мкм

Рисунок 2. Особенности структурной организации экстрацеллюлярного матрикса

ЭМ – экстрацеллюлярный матрикс; ПК – волокна протоколлагена. Ув. 10000

Рисунок 3. Ультраструктурные особенности строения ядер фибробластов и комплекса Гольджи. Ув. 20000

Рисунок 4. Инкубация фибробластов с магния оротатом

ЭМ – экстрацеллюлярный матрикс на поверхности клетки и ее отростков; В – волокна; В Фб – веретенообразные фибробласты; Пф – протофибриллы. Шкала bar 5мкм

Рисунок 5. Инкубация фибробластов с комбинацией магния и пиридоксина

ЭМ – экстрацеллюлярный матрикс; ВФб – веретенообразные фибробласты; Пф – протофибриллы. Шкала bar 5мкм

При добавлении в инкубационную среду магния оротата, а также магния в комбинации с пиридоксином в расположении фибробластов в образцах сохранялась та же закономерность, что и в контроле – в центре клеточных пластов более плотное расположение клеток по сравнению с периферией. При этом общее количество фибробластов в пласте в обеих группах визуально значительно превышало контрольную группу. На периферии пластов встречались фигуры деления фибробластов, которых было значительно больше в среде с магния оротатом. Форма фибробластов и их ядро-содержащие части были хорошо различимы лишь на периферии образцов. Объем матрикса в клеточных пластах обеих рассматриваемых групп был выше, чем в контроле (рис. 4). При добавлении магния оротата и магния в комбинации с пиридоксином во многих участках центра образцов матрикс выглядел наиболее массивным. При этом слой матрикса в препаратах, содержащих магния оротат, был более выраженным и занимал большую площадь. Фибробласты были погру-

жены в его толстый слой, и при этом границы клеток были плохо различимы, а ядро-содержащие части фибробластов слабо контурировались (рис. 2). На периферии образцов фибробластов располагались более свободно, что позволяло детализировать их морфологические особенности. Здесь от отростков фибробластов веретеновидной и полигональной форм происходила отшнуровка тонких фибрилл. Вблизи фибробластов находились как отдельные волокна, так и сетчатые структуры из волокон, погруженных в аморфный компонент ЭМ (рис. 5).

При трансмиссионном электронно-микроскопическом анализе в ядрах фибробластов образцов обеих групп доминировал эухроматин, определялись активные ядрышки в количестве 4-6, в составе последних (в отличие от контроля) значительно преобладал гранулярный компонент. Скопления гранул формировали широкие ореолы вокруг ядрышек. Ядерные поры были расширены. Цитоплазма фибробластов имела большое количество полирибосом и митохондрий, гипертрофи-

Рисунок 6. Инкубация фибробластов с магния сульфатом
ЭМ – экстрацеллюлярный матрикс на поверхности клетки и ее отростков; В Фб – веретенообразные фибробласты;
О – отростки клеток. Шкала bar 5мкм

рованные комплексы Гольджи, расширенные каналы гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети. Контуры фибробластов характеризовались множественными микровыростами и нечеткостью клеточных границ (Рис. 3).

При добавлении в культуральную среду магния сульфата увеличивалось общее количество фибробластов по сравнению с контролем, но при этом существенных отличий от морфологических характеристик Фб контрольных клеточных пластов и матрикса обнаружено не было (рис. 2, 6).

Обсуждение

Фибробласты, осуществляя синтез и резорбцию компонентов ЭМ, а также синтез и секрецию ряда регуляторных молекул поддерживают физиологический гомеостаз матрикса и соединительной ткани в целом, осуществляют их обновление, ремоделирование и репарацию при повреждении [10-12].

В контрольных образцах через 48 час инкубации присутствовали все морфологические признаки, характерные для фибробластов, культивируемых *in vitro*: овальная, вытянутая или полигональная форма клеточных тел, отростки цитоплазмы, складчатый рельеф и инвагинации поверхности. Ультраструктурные особенности фибробластов (деконденсация ядерного хроматина, умеренное развитие органелл органического синтеза, присутствующий слой матрикса совместно с приведенными выше данными сканирующей микроскопии) указывают на синтетическую и секреторную активность фибробластов и происходящие между ними и внеклеточным матриксом обменные процессы. При введении в среду магния оротата, а также магния в комбинации с пиридоксином возникали выраженные изменения морфофункционального статуса фибробластов, отсутствовавшие при введении магния сульфата. При этом фибробласты существенно активизировали синтетическую и секреторную деятельность, что выража-

лось в образовании в клеточном пласте хорошо сформированного аморфного и волокнистого компонентов ЭМ. В отдельных участках центра образцов при введении оротата магния ЭМ было настолько много, что фибробласты частично или полностью погружались в него. Активной продукции ЭМ способствовало и отмеченное в обеих группах увеличение численности фибробластов по сравнению с контролем.

Следует отметить, что активация пролиферации фибробластов могла быть стимулирована непосредственным воздействием магния. Наиболее отчетливо увеличение количества фибробластов происходило при добавлении магния сульфата (в этом препарате была наибольшая концентрация магния по сравнению с другими).

Ультраструктурные особенности фибробластов, культивированных в присутствии магния оротата и магния в комбинации с пиридоксином, характеризовались мультипликацией ядрышек, выраженным гранулярным компонентом в составе ядрышек и околядрышковых пространствах, представлявшим совокупность субъединиц рибосом, а также расширенных канальцев гранулярной эндоплазматической сети, что свидетельствовало об активном воспроизводстве в фибробластах аппарата для белкового синтеза. Присутствие в фибробластах двух рассматриваемых групп расширенных канальцев агранулярной эндоплазматической сети и гипертрофия множественных элементов комплекса Гольджи свидетельствуют о том, что параллельно белковому синтезу в фибробластах идет активный биосинтез

других органических молекул, составляющих ЭМ: гликопротеинов, гликолипидов, гликозаминогликанов, протеогликанов.

Не исключено, что большое значение в зарегистрированных изменениях морфофункциональных характеристик фибробластов и активации биосинтеза ЭМ имеют оротовая кислота и, в меньшей степени, пиридоксин, входящие в состав исследованных магниесодержащих препаратов [13, 14].

Добавление в инкубационную среду магния сульфата не является результативным в плане регуляции биосинтетических свойств исследованной культуры фибробластов.

Заключение

Проведенный сравнительный анализ действия магния оротата, магния в комбинации с витамином В₆, магния сульфата на морфофункциональные характеристики фибробластов клеточной культуры линии МССоу показал стимуляцию ионами магния пролиферативных свойств фибробластов. Также выявлено существенное, более значимое влияние магния оротата и, в меньшей степени, магния в комбинации с витамином В₆, суть которого состоит в активации биосинтеза аморфного и волокнистого компонентов ЭМ. В клинических условиях это может увеличивать диффузионные способности интерстиция органов.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература

1. Danilov RK, editor. Manual of Hematology. St. Petersburg: SpetsLit; 2011. Russian (Данилов Р.К., редактор. Руководство по гистологии. СПб.: Спец/Лит; 2011).
2. Killilea D. W., Maier J. A. M. A connection between magnesium deficiency and aging: new insights from cellular studies. *Magnesium Research* 2008; 21 (2): 77-82.
3. Domnitskaya M. T., Dyachenko AV, Kupriyanova OO, Domnitsky MV. The clinical significance of the use of magnesium orotate in adolescents with the syndrome of cardiac connective tissue dysplasia. *Kardiologiya* 2005; 45 (3): 76-81. Russian (Домницкая Т.М., Дьяченко А.В., Куприянова О.О., Домницкий М.В. Клиническое значение применения магния оротата у подростков с синдромом дисплазии соединительной ткани сердца. *Кардиология* 2005; 45(3): 76-81).
4. Shilov AM, Osiya SA. Magnesium deficiency and cardiovascular disease, pathophysiology and treatment in primary care. *Russkiy Meditsinskiy Zhurnal* 2014; (2): 156-9. Russian (Шилов А.М., Осия А.О. Дефицит магния и сердечно-сосудистые заболевания, патофизиология и лечение в условиях первичного звена здравоохранения. *Русский Медицинский Журнал* 2014; (2): 156-9).
5. Kovalenko VN. Manual of Cardiology. Kiev: Morion; 2008. Russian (Коваленко В.Н. Руководство по кардиологии. Киев: Морион; 2008).
6. Severin ES, editor. Biochemistry: Textbook for universities. Moscow: GEOTAR-Media; 2003. Russian (Северин Е.С., редактор. Биохимия: Учебник для вузов. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2003).
7. Kalacheva AG, Gromova OA, Kerimkulova NV, et al. Violations of the formation of connective tissue in children as a result of magnesium deficiency. *Lechashii Vrach* 2012; 3: 6-9. Russian (Калачева А.Г., Громова О.А., Керимкулова Н.В., и др. Нарушения формирования соединительной ткани у детей как следствие дефицита магния. *Лечащий Врач* 2012; 3: 6-9).
8. Avtandilov AG, Dzeranova KM, Borovaya TG, Didenko LV. Effect of magnesium orotate to connective tissue framework and inotropic cardiac function in patients with mitral valve prolapse. *Clinico-morphological study. Ration Pharmacother Card* 2013; 9 (4): 390-7. Russian (Автандилов А.Г., Дзеранова К.М., Боровая Т.Г., Диденко Л.В. Влияние оротата магния на соединительнотканый каркас и инотропную функцию сердца у пациентов с пролапсом митрального клапана. *Клинико-морфологическое исследование. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии* 2013; 9(4): 390-7).
9. Zigangirova N.A., Zayakin E.S., Kapotina L.N., et al. Development of Chlamydial Type III Secretion System Inhibitors for Suppression of Acute and Chronic Forms of Chlamydial Infection. *Acta Naturae* 2012; 4(2): 87-97.
10. Klishov AA. Histogenesis and tissue regeneration. Leningrad: Meditsina; 1984. Russian (Клишов А.А. Гистогенез и регенерация тканей. Л.: Медицина; 1984).
11. Bobrov LI. Fibroblasts and their significance in tissue reactions. *Arhiv Patologii* 1990; 52 (12): 65-8. Russian (Бобров Л.И. Фибробласты и их значение в тканевых реакциях. *Архив Патологии* 1990; 52 (12): 65-8).
12. Danilov RK Wound process: Gistogeneticheskaja base. St. Petersburg: Kirov' Military-Medical Academy; 2007. Russian (Данилов Р.К. Раневый процесс: гистогенетические основы. СПб.: ВМедА им. С.М.Кирова; 2007).
13. Torshin IY, Gromova OA, Fedotova LE, et al. Chemoinformation analysis of orotic acid molecule indicates antiinflammatory, neuroprotective and cardioprotective properties of the ligand magnesium. *Far-mateka* 2013; 13: 5-8. Russian (Торшин И.Ю., Громова О.А., Федотова Л.Э., и др. Хемоинформационный анализ молекулы оротовой кислоты указывает на против-воспалительные, ней-ропротекторные и кардиопротекторные свойства лиганда магния. *Фарматека* 2013; 13: 5-8).
14. Gromova OA, Torshin IY. Magnesium and pyridoxine: basic knowledge. 2nd edition. Moscow: Mik-losh; 2012. Russian (Громова О. А., Торшин И. Ю. Магний и пиридоксин: основы знаний. 2-е издание. М.: Миклош; 2012).

Поступила: 27.03.2015

Принята в печать: 06.04.2015