

ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОЛІФЕРАЦІЇ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ В УМОВАХ ЗМІНЕНОГО ГАЗОВОГО СЕРЕДОВИЩА

Плотнікова Л.М., Березовський В.Я., *Рубан Т.П., *Лукаш Л.Л., Янко Р.В.

*Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України; *Інститут молекулярної біології і генетики НАН України*

Плотнікова Л.М., Березовський В.Я., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л., Янко Р.В. Інтенсивність проліферації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин людини в умовах зміненого газового середовища // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 120-123.

Досліджено вплив газових сумішей зі зниженим вмістом кисню на проліферативну активність мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) лінії 4BL. Проліферативний потенціал досліджуваних клітин, що зазнавали впливу 3% O₂ на протязі третьої доби культивування знизився у 2 рази. При інкубуванні клітин у середовищі з 5% O₂ та 10% O₂ не виявлено ознак гальмування клітинного поділу порівняно з контролем (21% O₂). Концентрація загального білку у культуральному середовищі на третю і четверту добу культивування при 10% O₂ була на 35-36% вищою порівняно з контролем. Ми вважаємо, що дозоване зменшення вмісту кисню у газовому середовищі інкубування сприяє підвищенню функціональної активності клітин людської лінії 4BL.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, проліферація, дозована гіпоксія.

Плотнікова Л.Н., Березовський В.А., Рубан Т.А., Лукаш Л.Л., Янко Р.В. Інтенсивность пролиферации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека в условиях измененной газовой среды // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 120-123.

Изучено влияние газовых смесей с пониженным содержанием кислорода на пролиферативную активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) линии 4BL. Проліферативный потенциал исследуемых клеток, подвергавшихся воздействию 3% O₂ (24 час) на третьи сутки культивирования снизился в 2 раза. При инкубации клеток в среде с 5% O₂ и 10% O₂ не установлено признаков торможения пролиферации по сравнению с контролем (21% O₂). Концентрация общего белка в культуральной среде на третьи и четвертые сутки культивирования при 10% O₂ была на 35-36% выше по сравнению с контролем. Мы предполагаем, что дозированное уменьшение содержания кислорода в газовой среде инкубирования способствует повышению функциональной активности клеток человека линии 4BL.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, пролиферация, дозированная гипоксия.

Plotnikova L.N., Berezovsky V.A., Ruban T.A., Lukash L.L., Yanko R.V. The proliferation intensity of human multipotent mesenchymal stromal cells in the modified gas medium // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 120-123.

The effect of gas mixtures with reduced oxygen content on the proliferative activity of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSK) line 4BL. The proliferative potential of cells exposed at 3% O₂ (24 h) on the third day of cultivation was reduced in 2 times. Incubation of studied cells in gas medium with 5% O₂ and 10% O₂ did not reduce cell proliferation compared with control (21% O₂). The concentration of total protein in the culture medium on the third and fourth day of cultivation at 10% O₂ was 35-36% higher comparing with the control level. We believe that the dose-reduction of oxygen in the incubation gas medium promote increasing the functional activity of human cell line 4BL.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, proliferation, dosed hypoxia.

Вступ. Основними клітинами сполучної тканини є фібробласти. Вони відіграють провідну роль у синтезі компонентів міжклітинної речовини (проколагену, проеластину, фібронектину, глікозаміногліканів тощо), а також деяких факторів росту [6]. Беруть участь у процесах епітелізації та загоєнні ран. Після пошкодження шкірного покриву фібробласти мігрують із країв рани та синтезують елементи позаклітинного матриксу [5]. Безпосередньо у рані, куди фібробласти не можуть мігрувати самостійно, з'являються фібробластоподібні клітини із кров'яного русла, що сприяє прискоренню регенерації тканин [13, 14]. Останні можуть бути мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами (ММСК), що диференціюються у різні типи клітин мезодермального ряду [4].

Процес регенерації регулюється як сигнальними молекулами, так і складом газового середовища, який впливає на всі основні життєві функції клітин – проліферацію, інтенсивність енергетичного метаболізму, життєздатність. У сучасних дослідженнях культивування клітин зазвичай здійснюють в умовах стандартної атмосфери (CA) при вмісті кисню 21% O₂ з додаванням 5% CO₂. Проте в організмі концентрація кисню значно менша: в артеріальній крові концентрація O₂ становить біля 12,5%, у венозній крові складає приблизно 5%, а в цільних тканинах – ще менше [9].

На швидкість росту клітин у культурі впливають різні фактори: температурні умови культивування, кількість пасажів, тип використовуваних живильних середовищ, якість фідеру, сиро-

ваток тощо. Роботи по дослідженню впливу зниженого вмісту кисню на проліферативну активність фібробластоподібних клітин поодинокі. Висновки цих робіт неоднозначні, що може бути пов'язано з різними умовами проведення експерименту, а саме: використанням різного режиму та інтенсивності впливу гіпоксичної газової суміші, тривалістю експерименту тощо [1, 3, 4, 15].

Метою даної роботи було дослідити вплив зниженого вмісту кисню у газовому середовищі інкубування на проліферативну активність клітин людини лінії 4BL.

Матеріали і методи. Клітинна лінія 4BL – це фібробластоподібні клітини, одержані з периферійної крові здорового донора і переведені в умови стандартної моношарової культури. Лінію клітин 4BL отримано і досліджено у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [7, 8]. Клітинна лінія 4BL успішно пройшла ліміт Хейфліка та культивується вже понад 220 пасажів. За час культивування не помічали ознак клітинного старіння, кризи та зміни морфології, що дає підстави вважати її потенційно іморталізованою. Однак виявлено зміни каріотипу і хромосомні перебудови [8]. Аналогічні спостереження зроблено при одержанні ліній клітин миші [12].

Для вирощування клітин лінії 4BL використовували середовище Ігла у модифікації Дюльбекко (DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium) ("Sigma", США) із додаванням 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 10 % ембріональної сироватки теляти ("Sigma", США). Клітини культивували при 37 °С у скляних чашках Петрі (d=35 мм). Контрольні клітини тримали в стандартних умовах CO₂-інкубатора: 5% CO₂ і 95% повітря (21% O₂). У дослідних варіантах використано три газові суміші зі зниженим (відносно атмосферного повітря) парціальним тиском кисню наступного складу: 1) 3% O₂ + 5% CO₂ + 92% N₂; 2) 5% O₂ + 5% CO₂ + 90% N₂; 3) 10% O₂ + 5% CO₂ + 85% N₂.

Для визначення проліферативної активності клітини досліджуваної лінії розсівали по 50 тис клітин на чашку Петрі і додавали по 2 мл ростового середовища. Клітини інкубували протягом 24 годин у газовій суміші (3% O₂, або 5% O₂, або 10% O₂), потім переносили у CO₂-інкубатор без зміни поживного середовища. Клітини знімали за допомогою суміші 0,25% трипсин і 0,02% ЕДТА (рН 7,5) (1:1) на третю (72 год) й четверту (96 год) добу культивування та підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва [11]. Дослід повторювали 3-4 рази. Вивчення морфологічних характеристик проводили під мікроскопом Jenaval ("Carl Zeiss", Germany, об'єктив 40× та 100×). Мікрооб'єкти фотографували за допомогою фотоапарата Canon, приєднаного до мікроскопу.

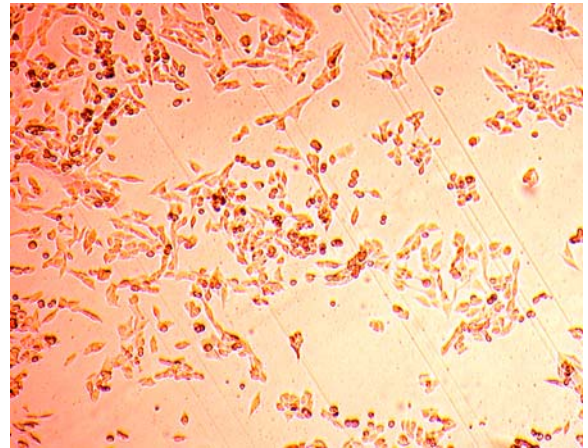
У культуральній рідині визначали концентрацію загального білка біуретовим методом з

використанням стандартних наборів реактивів (B06.01, "Вітал Діагностик СПб", Санкт-Петербург).

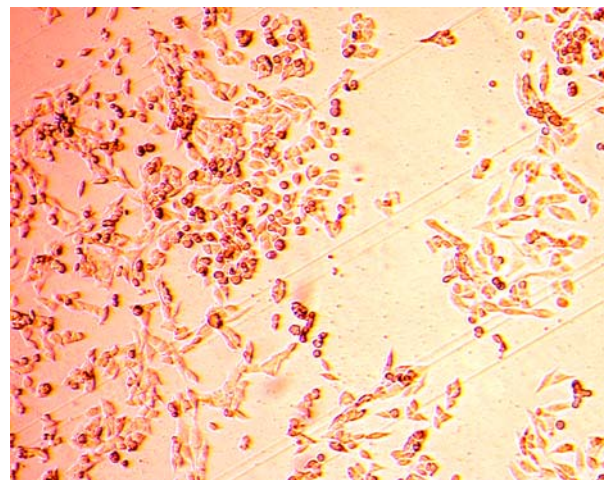
Цифрові дані обробляли з використанням програми Microsoft Excell 2003 та програми OriginPro 7.5. Для оцінки статистичної вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували t-критерій Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення.

Під світловим мікроскопом переважна більшість клітин лінії 4BL мають пластинчасту витягнену форму з відростками (рис. 1), але зустрічаються і епітеліоїдні клітини.



А



Б

Рис. 1. Клітинна лінія 4BL людини на третю добу культивування в умовах нормоксії (21% кисню – А) та гіпоксії (5% кисню – Б). Живі незабарвлені клітини. 3б. ×100.

Морфологічних відмінностей між клітинами людини лінії 4BL контрольної (стандартні умови CO₂-інкубатора з 21% O₂) та дослідних варіантів, що піддавалися 24-х годинному культивуванню при 3% O₂, 5% O₂ чи 10% O₂ не виявлено. Клітини даної лінії більш-менш однорідні за розмірами та мають округле ядро. При низькій щільності клітин у популяції переважали фібробластоподібні клітини, а також у незначній кількості траплялись епітеліоїдні клітини. З

невисокою частотою зустрічались круглі клітини, які відкріплювались від поверхні та переходили у суспензію. Така морфологічна неоднорідність характерна для ММСК. Відносно фіброblastів у культурі це пояснюють динамікою морфології клітин протягом клітинного циклу [12].

Попередніми дослідженнями встановлено, що клітини лінії 4BL мають властивості ММСК: здатні диференціюватися в остеогенному, адипогенному та міогенному напрямках у відповідь на дію відповідних стимулів [7, 8]. Відомо, що вирощування ММСК при знижених концентраціях кисню у середовищі інкубування може впливати на їхній проліферативний потенціал [1, 3, 4, 9].

Результати проведених нами досліджень показали, що проліферативна активність клітин лінії 4BL у газовій суміші з 3% O₂ та в умовах стандартної атмосфери (СА) істотно відрізняються. На третю добу культивування після 24-х годинного впливу 3% O₂ кількість клітин була у 2 рази нижчою порівняно з контролем (рис. 2, а). Через 96 годин культивування при СА в середньому на чашках Петрі налічувалось 313 – 327 тис кл/мл. При інкубуванні клітин у газових середовищах з 5% O₂ та 10% O₂ спостерігали тенденцію до збільшення кількості клітин: 330 – 363 тис кл/мл порівняно з контролем (рис. 2, б).

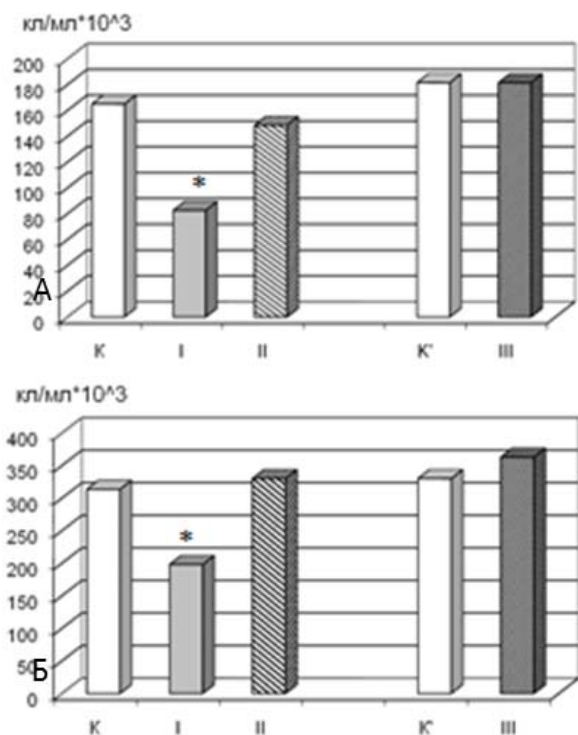


Рис. 2. Проліферативна активність клітин лінії 4BL контрольних (К, К') і дослідних (І – 3% O₂, ІІ – 5% O₂, ІІІ – 10% O₂) варіантів на третю (а – 72 год) та четверту (б – 96 год) добу культивування. *P<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем.

Зміни проліферативної активності клітин в умовах дозованої гіпоксії можуть бути пов'язані з

регуляторним впливом транскрипційного фактору HIF (Hypoxia-inducible factors). Активіація транскрипційного фактора HIF-1α є універсальною відповіддю клітин на гіпоксію і виявлена у різних типах клітин [4, 16, 17].

Таким чином, культивування ММСК при 3% O₂ протягом 24 годин призводило до значного зниження проліферативного потенціалу досліджуваної культури. На відміну, при інкубації клітин в умовах 5% O₂ та 10% O₂, не тільки не виявлено пригнічення проліферації, а навпаки – спостерігалась тенденція до стимулювання поділу клітин лінії 4BL, хоча статистично достовірних змін кількості клітин у цьому експерименті не спостерігали.

Ще одним показником стану клітин в умовах *in vitro* може бути їхня метаболічна активність. Концентрація загального білку у безклітинному культуральному середовищі на третю добу культивування у дослідних пробах (3% O₂, 5% O₂) була вищою на 14% (P<0,05), а при 10% O₂ – на 35% порівняно з контролем (рис. 3, а). На четверту добу спостерігали статистично вірогідне зростання концентрації білку (на 36%) при 10% O₂, а у інших досліджуваних пробах цей показник практично не відрізнявся від значень контролю (рис. 3, б).

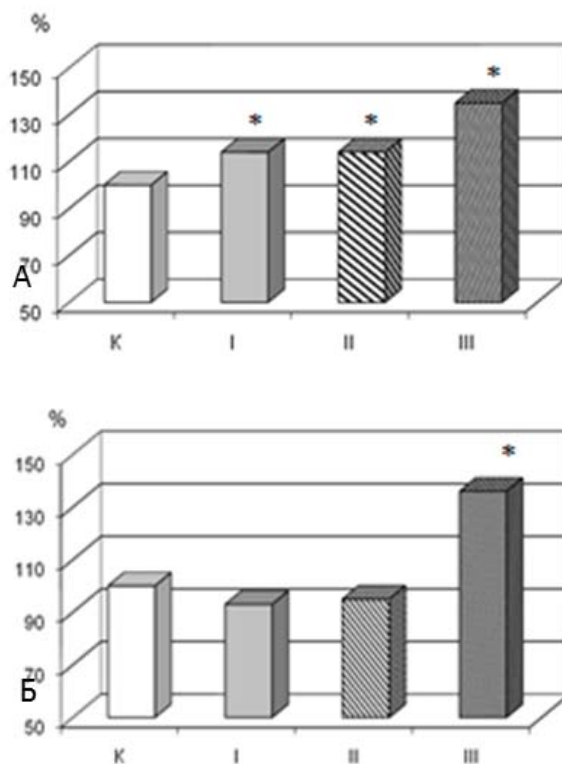


Рис. 3. Концентрація загального білка у культуральній рідині контрольної (К) і дослідних (І – 3% O₂, ІІ – 5% O₂, ІІІ – 10% O₂) варіантах на третю (а – 72 год) та четверту (б – 96 год) добу культивування. *P<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем.

У клітинній терапії усе ширше використовуються ММСК, особливо при лікуванні масивних і глибоких опіків [10]. Ці клітини у культурі

зберігають проліферативний потенціал і мультипотентність. За нашими даними істотно зниження вмісту кисню у газовому середовищі інкубації позитивно впливає на проліферативну та метаболічну активність мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин людини. Фібробластоподібні клітини синтезують і секретують білки та глікозаміноглікани, які формують компоненти міжклітинної речовини сполучної тканини, що сприяє загоєнню ран. Закінчуючи цикл розвитку, фібробласти перетворюються на фіброцити. Цитоплазма фіброцитів збіднюється на органели, клітини набувають плоскої форми, проліферативний потенціал істотно знижується. Проте фіброцити зберігають здатність брати участь у регуляції обмінних процесів у тканині [2, 5, 6].

Висновки:

1. Культивування клітин лінії 4BL, що мають властивості ММСК, при зниженій концентрації кисню (3%) протягом 24 годин призводило до 2-кратного зменшення кількості клітин відносно контролю, проте морфологічних ознак дегенерації цих клітин не виявлено.

2. Газові суміші з концентрацією кисню 5% O₂ та 10% O₂ не впливали на інтенсивність проліферації досліджуваних клітин.

3. При інкубації клітин лінії 4BL у газовому середовищі з 10% O₂ на третю і четверту добу культивування спостерігали статистично вірогідне зростання концентрації загального білку (на 35-36%) в рідкому культуральному середовищі.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Астахова В.С., Березовський В.Я., Панченко Л.М., Хасабова І.А. Клонування стромальних клітин-попередників кісткового мозку людини за умов зниженого парціального тиску кисню // Фізіол. журн. – 2001. – Т. 47, №1. – С. 40-44.
2. Бозо І.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. «Фібробласт» — спеціалізована клітка или функціональне состояние кліток мезенхімного походження? // Цитологія. – 2010. – Т. 52, № 2. – С. 99-109.
3. Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Жамбалова А.П., Козионова М.П. Характеристика мезенхімальних стромальних кліток из ліпоаспірата человека, культивіруємих при пониженому содержанию кислорода // Цитологія. – 2009. – Т. 51, №1. – С. 5-11.
4. Жамбалова А.П., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б., Гальчук С.В., Романов Ю.А. Влияние пониженого содержания кислорода на дифференцировку мультипотентных стромальних кліток костного мозга человека in vitro // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, №3. – С. 47-51.
5. Зорин В.А., Зорина А.И., Петракова О.С., Черкасов В.Р. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, №4. – С. 26-40.
6. Зорина А.И., Зорин В.А., Черкасов В.Р.

Дermalные фибробласты: разнообразие фенотипов и физиологических функций, роль в старении кожи // Эстетическая медицина. – 2012. – Т. 11, №1. – С. 15-31.

7. Лукаш Л.А., Яципина А.П., Кушнірук В.О., Підпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека in vitro // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – Т. 11. – С. 493-498.

8. Кушнірук В.О., Кочубей Т.П., Мацевич Л.А., Рубан Т.П., Лукаш Л.А. Дослідження каріотипу нової лінії клітин людини 4BL6 при тривалому культивуванні in vitro // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2012. – Т. 3. – С. 313-318.

9. Панюхин Н.В., Вишнякова Х.С., Егоров Е.Е. Влияние парціального давления кислорода на выживаемость, пролиферацию и дифференцировку мезенхімальних стволых клеток из костного мозга мыши // Биологические мембраны. – 2008. – Т. 25, №5. – С. 352-359.

10. Расулов М.Ф. Использование мезенхімальних стволых клеток костного мозга и эмбриональных фибробластов в лечении ожоговых ран // Pacific Medical Journal. – 2004. – №4. – С. 7-9.

11. Топчий М.К., Корнюшенко Н.П. Руководство к практическим занятиям по вирусологии – К.: Изд-во Киев. ун-та, 1967. – 93 с.

12. Яципина А.П., Підпала О.В., Рубан Т.П., Тимошук О.В., Лукаш Л.А. Цитоморфологічна характеристика нової клітинної лінії миші G1 // Цитологія и генетика. – 2006. – №3. – С. 49-58.

13. Abe R., Donnelly S. C., Peng T., Bucala R., Metz C. N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. // J. Immunol. – 2001. – V.166. – P. 7556-7562.

14. Chesney J., Metz C., Stavitsky A., Bacher M., Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. // J. Immunol. – 1998. – V.160. – P. 419-425.

15. Ren H., Cao Y., Zhao Q., Li J., Zhou C., Liao L., Jia M., Zhao Q., Cai H., Han Z. C., Yang R., Chen G., Zhao R. C. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – V.347. – P. 12-21.

16. Semenza G.L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor // Genes Dev. – 2000. – V.14. – P. 1983-1991.

17. Smith TG, Roblins PA, Ratelife PJ. The human side of hypoxia-inducible factor. Brit. J. Haematol. – 2008. – V.141. – P. 325-334.

Надійшла 18.11.2012 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін