

Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський

## Реакція фібробластоподібних клітин крові на знижений парціальний тиск кисню

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: lidiiianik@i.ua*

*Досліджено вплив зниженого парціального тиску кисню ( $P_{O_2}$ ) на проліферацію та активність лужної фосфатази фібробластоподібних клітин лінії 4BL людини виділених із крові. Інкубування клітин по 8 год протягом 3 діб при рівні  $P_{O_2}$  38 та 76 мм рт. ст. стимулює їх проліферативний потенціал на 27 і 45 % відповідно порівнянно з контролем. Виявлено зменшення активності лужної фосфатази (маркер формування кісткової тканини) на 25 % при зниженні  $P_{O_2}$ . Отримані нами результати дають змогу зробити висновок про гальмування диференціації клітин лінії 4BL в остеогенному напрямку при концентрації кисню у газовому середовищі 5 та 10 % порівняно з контролем (21%  $O_2$ ). Ключові слова: фібробластоподібні клітини, парціальний тиск кисню, проліферація, диференціація.*

### ВСТУП

Мезенхімальні стромальні (стовбурові) клітини (МСК) людини знаходяться в кістковому мозку, жировій тканині, шкірі, тканинах серця, плаценті, пуповинній крові, а також в інших органах і тканинах [1–4]. У культурі МСК мають здатність до активної проліферації. Їхня зупинка завершується спонтанною диференціацією *in vitro* в клітини кісткової (остеогенні клітини), жирової (адипоцити), хрящової (хондроцити), м'язової (міоцити) або сполучної тканини (фібробласти) [5]. Умови культивування (склад культурального середовища, фактори росту, індуктори диференціювання) відіграють важливу роль у реалізації функціональних можливостей клітин. Показано, що парціальний тиск кисню ( $P_{O_2}$ ) в позаклітинному середовищі, який зумовлює внутрішньоклітинну концентрацію кисню, також є одним з істотних факторів, що впливає на проліферацію, життєздатність, диференціювання, а також на морфологічні та імунофенотипічні показники клітин [6–10]. Проте їхні висновки неоднозначні. Це може бути пов'язано з вибором культури клітин,

© Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський

а також умовами проведення експерименту, а саме: використанням різного часового режиму та неоднакової інтенсивності впливу газової суміші.

Мета нашої роботи – дослідження впливу зниженого до 38 і 76 мм рт. ст.  $P_{O_2}$  на проліферацію та активність лужної фосфатази (маркерний показник остеогенного диференціювання) МСК лінії 4BL людини.

### МЕТОДИКА

МСК лінії 4BL – це фібробластоподібні клітини, отримані з периферичної крові здорового донора у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [11, 12]. Клітини культивували в середовищі DMEM («Sigma», США) з додаванням 10 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби («Sigma», США), 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Контрольну групу культивували в умовах стандартної атмосфери  $CO_2$ -інкубатора (21 %  $O_2$  – 159 мм рт. ст.; 5 %  $CO_2$  і 74%  $N_2$ ) при 37°C. Клітини дослідних груп інкубували

протягом 8 год на добу (3 доби) при двох значеннях  $P_{O_2}$ : 38 (5 %  $O_2$ ) і 76 мм рт. ст. (10 %  $O_2$ ), потім переносили в  $CO_2$ -інкубатор без зміни живильного середовища. Для визначення проліферативної активності культуру досліджуваної лінії розсівали по 50 тис. клітин у скляні чашки Петрі (діаметром 35 мм). Клітини ферментативно знімали за допомогою суміші 0,25%-го розчину трипсину і 0,02 % ЕДТА (рН 7,5; 1:1) на 3-тю й 4-ту добу культивування та підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва [13, 14]. Активність лужної фосфатази (ЛФ) використовували як маркерний показник для підтвердження диференціювання МСК в остеобласти. Біохімічним методом у культуральній рідині з використанням стандартних наборів реактивів (ЛФ, НР016.01, «Філісіт-Діагностика», Україна) вимірювали активність ЛФ.

Цифрові результати обробляли з використанням програми Microsoft Excell 2003 та програми OriginPro 8,0. Для оцінки статистичної вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами результати показали, що при всіх варіантах інкубування проліферативна активність МСК на 3-тю добу вірогідно не

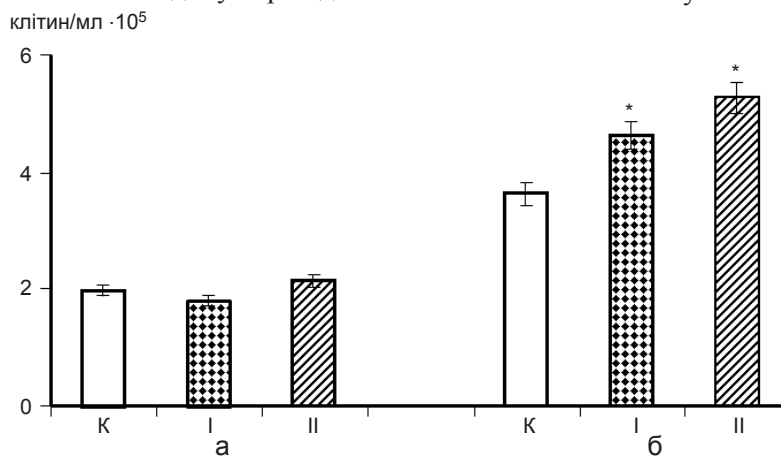


Рис. 1. Проліферативна активність клітин лінії 4BL людини, які культивували в умовах стандартної атмосфери (К – 159 мм рт. ст.) і зниженому парціальному тиску кисню (I – 38, II – 76 мм рт. ст.) на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу. \* $P < 0,05$  – статистична вірогідність порівняно з контролем

відрізнялася від контрольних значень (рис. 1, а). На 4-ту добу культивування після впливу  $P_{O_2}$  38 мм рт. ст. кількість клітин ( $P < 0,05$ ) зростала і становила 462 тис. клітин/мл у порівнянні з контролем (363 тис. клітин/мл). Більш виражене підвищення кількості клітин відбувалося і при рівні  $P_{O_2}$  76 мм рт. ст. – 528 тис. клітин/мл (див. рис. 1,б). Ці результати дають змогу зробити висновок, що зниження концентрації кисню в газовому середовищі інкубації до 5 і 10 % при культивуванні мультипотентних МСК людини лінії 4BL збільшує їх кінцеву проліферативну активність на 27 і 45 % відповідно порівняно з контролем. При цьому максимальний ефект отримано при 10 %  $O_2$ . Можливо це відбувається у зв'язку з тим, що у фізіологічних умовах цілого організму тканинне  $P_{O_2}$  в 2–4 рази нижче, ніж в атмосферному повітрі інкубатора.

Результати проведених біохімічних досліджень показали вірогідне зниження активності ЛФ у культуральній рідині на 33 % порівняно з контролем при рівні  $P_{O_2}$  38 мм рт. ст. на 3-тю добу культивування (рис. 2,а). На 4-ту добу – активність ЛФ зменшилась як при 38 мм рт. ст., так і при 76 мм рт. ст. на 25 % ( $P < 0,05$ ; див. рис. 2,б). Такі зміни дають змогу вважати, що остеогенне диференціювання МСК лінії 4BL людини залежить від рівня  $P_{O_2}$  у газовій фазі середовища. Зниження цього показника гальмує остеогенну диференціа-

цію. З максимальною виразністю цей процес відбувається в умовах атмосферного рівня  $PO_2$  (159 мм рт. ст.).

Отримані результати узгоджуються з літературними даними інших дослідників, які показали, що зниження концентрації кисню в газовому середовищі з 21 до 3 % гальмує остеогенний потенціал культури МСК отриманої з тканин ротової порожнини людини [15] і кісткового мозку миші [16]. Жамбалова та співавт. [17] дослідили здатність мультипотентних МСК кісткового мозку людини до диференціації в умовах зниженого вмісту кисню (1 і 5 %  $O_2$ ). При інкубації клітин у нормоксичних (21 %  $O_2$ ) умовах і при зниженому вмісті кисню виявлена різна ступінь здатності МСК до диференціювання в остеогенному, адипогенному і ендотеліальному напрямках. У середовищі з 5 %  $O_2$  спостерігали незначне зниження здатності МСК до мінералізації позаклітинного матриксу і накопиченню ліпідних крапель у порівнянні з контролем (21 %  $O_2$ ). При концентрації  $O_2$  1 % МСК практично повністю втратили здатність до мінералізації матриксу і не диференціювалися в адипоцитарному напрямку. При культивуванні МСК протягом 3 тиж з 5 та 21 %  $O_2$  вірогідних відмінностей у диференціюванні в ендотеліальному напрямку не виявлено. Характерним морфофункціональним показником ефективності такого диференціювання була здатність

МСК утворювати капіляроподібні структури на екстраклітинному матриксі в культурі з додаванням ендотеліального фактора росту.

Основним регулятором адаптації клітин до умов зниженого  $PO_2$  є фактор індукований гіпоксією (HIF-1), який модулює роботу багатьох генів [18]. Він складається з 2 субодиниць: киснечутливої HIF-1 $\alpha$  та конститутивної HIF-1 $\beta$ . Порівняльний аналіз даних, отриманих Риловою та співавт. [19] при дослідженні експресії генів МСК жирової тканини, показав, що в умовах зниженого до 5 % вмісту кисню відбувалося збільшення рівня експресії генів, які відповідають за вступ клітин у клітинний цикл і позитивно регулюють їх проліферацію. Серед них гени родини Fos (FOSB і FOSL1), що кодуєть білки, які, димеризуючись із білками родини Jun, беруть участь у формуванні білка-активатора 1 (AP1); гени PCNA і CCND2, продукти яких являють собою цикліни (необхідні для переходу клітин з фази  $G_1$  в S-фазу синтезу ДНК), а також ген CKS2, який кодує регуляторну субодиницю циклінзалежної кінази. Крім того, у відповідь на знижений вміст кисню зменшувалась експресія CDKN2C – гена-інгібітора циклінзалежної кінази. Встановлено, що максимальну активність HIF-1 виявляє при концентрації кисню близько 0,5 % [20].

У нашій попередній праці [21] виявлено 2-кратне зниження проліферативної актив-

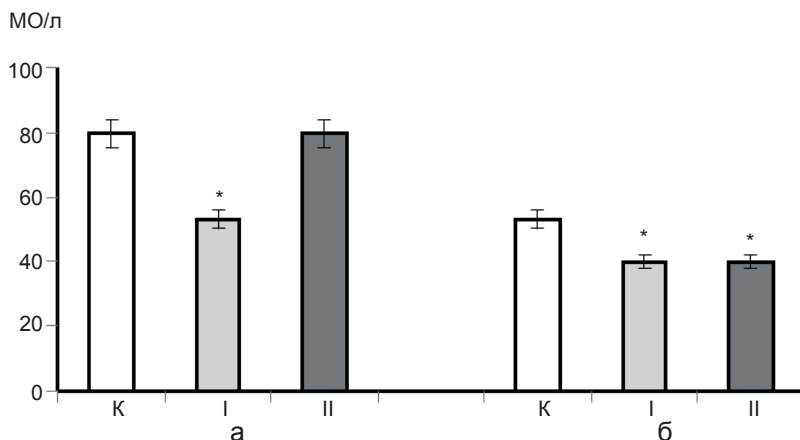


Рис. 2. Активність лужної фосфатази у культуральній рідині мезенхімальних стромальних клітин контрольних (К – 21 %  $O_2$ ) і дослідних (I – 5 %  $O_2$ , II – 10 %  $O_2$ ) зразків на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. \* $P < 0,05$  – статистична вірогідність порівняно з контролем

ності мультипотентних МСК, виділених із периферичної крові людини при рівні  $P_{O_2}$  22–23 мм рт. ст. (3 % кисню). З літературних даних відомо, що низьке напруження  $O_2$  8–23 мм рт. ст. (1 і 3 %) може стабілізувати частку МСК людини у стані спокою [22]. Цим можна пояснити зниження проліферації і диференціації МСК при зазначених концентраціях кисню. У сучасних дослідженнях культивування клітин зазвичай здійснюють при вмісті кисню 21 % – це набагато вище, ніж у тканинах організму. В артеріальній крові концентрація  $O_2$  становить близько 12,5 %, у венозній крові – 5 %, а у кістковому мозку варіює від 1 до 7 % [23, 24]. Буравкова зі співав. [25] показали, що проліферативна активність МСК із ліпоаспірату людини в умовах зниженого  $P_{O_2}$  38 мм рт.ст. була в середньому в 2,9 раза вищою в порівнянні з культивуванням у стандартних умовах (21 %  $O_2$ ). Зменшення вмісту кисню в середовищі культивування не змінювало життєздатність і імунофенотип МСК із ліпоаспірату людини

Таким чином, концентрація кисню у середовищі інкубування здатна впливати не тільки на проліферацію клітин, але і на ефективність їх диференціювання. Отримані нами результати свідчать, що інкубування фібробластоподібних клітин людини лінії 4BL в середовищі зі зниженим вмістом кисню (5 і 10 %) може виявитися корисною модифікацією технології культивування, здатною забезпечити отримання більшої кількості клітин за менший час. Це може бути використано в галузі комбустіології та відновлювальної терапії.

## ВИСНОВКИ

1. Культивування МСК лінії 4BL людини у газовому середовищі з 5 та 10 %  $O_2$  протягом 8 год на добу (3 дні) вірогідно підвищує проліферативну активність фібробластоподібних клітин на 27 і 45 % відповідно порівняно з контролем.

2. Остеогенна диференціація клітин лінії 4BL людини, маркерним показником якої є

активність ЛФ, у разі зниженого парціального тиску кисню (38 і 76 мм рт. ст.) відбувалася на 25 % повільніше, ніж в умовах атмосферного кисню (159 мм рт. ст.).

**Л.Н. Плотникова, В.А. Березовский**

## РЕАКЦИЯ ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК КРОВИ НА Пониженное парциальное Давление Кислорода

Исследовано влияние пониженного парциального давления кислорода ( $P_{O_2}$ ) на пролиферацию и активность щелочной фосфатазы фибробластоподобных клеток линии 4BL человека, выделенных из крови. Инкубирование клеток по 8 ч в течение 3 сут при уровне  $P_{O_2}$  38 и 76 мм рт. ст. стимулирует их пролиферативный потенциал на 27 и 45 % соответственно в сравнении с контролем. Выявлено снижение активности щелочной фосфатазы (маркер формирования костной ткани) на 25% при снижении  $P_{O_2}$ . Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о торможении дифференциации клеток линии 4BL в остеогенном направлении при концентрации кислорода в газовой среде 5 и 10 % по сравнению с контролем (21 %  $O_2$ ). Ключевые слова: фибробластоподобные клетки, парциальное давление кислорода, пролиферация, дифференциация.

**L.N. Plotnikova, V.A. Berezovskii**

## REACTION OF FIBROBLAST-LIKE BLOOD CELLS TO A LOW PARTIAL OXYGEN PRESSURE

We investigated the effect of a low partial oxygen pressure ( $P_{O_2}$ ) on the proliferation and alkaline phosphatase activity of human fibroblast-like cells line 4BL, isolated from blood. The cells incubation for 3 days (8 hours daily) at the level of  $P_{O_2}$  38 and 76 mm Hg stimulates the proliferative potential of their by 27 and 45% respectively, compared to the control. It was shown a reduction in the activity of alkaline phosphatase (a marker of bone formation) by 25% while reducing  $P_{O_2}$ . Our data suggest inhibition of osteogenic differentiation of cells line 4BL when the oxygen concentration in the gas atmosphere of 5 and 10%  $O_2$  compared with control (21%  $O_2$ ).

Key words: fibroblast-like cells, oxygen partial pressure, proliferation, differentiation.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv*

## REFERENCES

1. Suzdaltsev YG, Burunova VV, Vakhrouchev IV, Yarygin VN, Yarygin KN. Comparison ability to differentiate into mesenchymal tissue of mesodermal cells of human origin isolated from a variety of sources. Cell techniques in biology and medicine. 2007; 1: 3–10.

2. Diaz-Prado S., Muinos-Lopez E., Hermida-Gomez T. et al. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J. Cell Biochem.* 2010; 111 (4): 846–57.
3. Hegyi B., Sagi B., Kovacs J. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int. Immunology.* 2010; 22 (7): 551–59.
4. Maddalena S, Elsa V, Lucia G, Fausto Z, Marco D, Alberto A, Georg S, Ornella P. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007; 1 (4): 296–305.
5. Kiseleva EV, Chermnykh ES, Vorotelyak EA, Volozhin AI, Vasiliev AV, Terskikh VV. Comparison of fibroblasts-like cell differentiation capacities of human bone marrow, adipose tissue, hair papilla and dermal fibroblasts. *Cytology.* 2009; 51 (1): 12–19.
6. Astakhova V, Berezovskii V, Panchenko L, Khasabova I. The stromal cells of human bone-marrow cloning by of low partial oxygen pressure. *Fiziologichnyj Zhurnal.* 2001; 47 (1): 40–44.
7. Astakhova V. Osteogenic cell precursors from human bone marrow. *Kiev: Phoenix.* 2000: 176 p.
8. Buravkova L, Valyushkina M, Andreeva E, Loginov V. Reparative osteogenesis transplantation multipotent bone marrow stromal cells, culturing at a different oxygen tension. *Morphology.* 2011; 139 (1): 81–85.
9. Valyushkina M, Buravkova L. Effect of O<sub>2</sub> in the medium on multipotent mesenchymal progenitor cells from bone marrow of different ages rats. *Medical Academic Journal.* 2012; 12 (3): 57–59.
10. Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, Jia M, Zhao Q, Cai H, Han ZC, Yang R, Chen G, Zhao RC. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 347: 12–21.
11. Lukash L, Yatsishina A, Kushniruk V, Pidpala O. Reprogramming of somatic cells in the adult human in vitro. *Factors experimental evolution of organisms.* 2011; 11: 493–98.
12. Kushniruk VA, Kochubej TP, Matsevych LL, Ruban TP, Lukash LL. Research karyotype new line of human cells 4BL6 prolonged cultivation in vitro. *Factors experimental evolution of organisms.* 2012; 3: 313–18.
13. Adams R. *Methods of cell culture for biochemists.* Moscow: Mir. 1983: 264 p.
14. Pinaeva G. *Methods of cell culturing.* Collection of Scientific Papers. Leningrad: Nauka. 1988: 287 p.
15. Burnaevsky NS, Vishnyakova KhS, Safenina AV, Rybalko DV, Popov KV, Egorov EE. Effects of oxygen partial pressure on the efficacy of colony formation and differentiation of human mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Cell transplantation and tissue engineering.* 2010; 5 (4): 24–30.
16. Panyuhin NV, Vishnjakova HS, Egorov EE. Influence oxygen partial pressure on the survival, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Biological membranes.* 2008; 25 (5): 352–59.
17. Zhambalova AP, Gershovich YuG, Buravkova LB, Gal'chuk SV, Romanov YuA. Effects of low oxygen levels on differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells of human bone marrow in vitro. *Cell transplantation and tissue engineering.* 2009; 4 (3): 47–51.
18. Semenza G.L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 2000; 14: 1983–91.
19. Rylova YuV, Buravkova LB. Long-term expansion of multipotent mesenchymal stromal cells under reduced oxygen tension. *Cytology.* 2013; 55 (12): 852–60.
20. Plotnikova LN, Berezovsky VA, Ruban TA, Lukash LL, Yanko RV. The proliferation intensity of human multipotent mesenchymal stromal cells in the modified gas medium. *Ukrainian morphological almanac.* 2013; 11 (1): 120–123.
21. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 2006; 91 (5): 807–19.
22. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister S, Handgretinger R, Kerst G, Müller I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biology.* 2010; 11: 1–11.
23. Lin Q, Kim Y, Alarcon R, Yun Z. Oxygen and Cell Fate Decisions. *Gene Regulation and Systems Biology.* 2008; 2: 43–51.
24. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone.* 2006; 39 (3): 513–22.
25. Buravkova LB, Grinakovskaya OS, Andreeva ER, Zhambalova AP, Kozionova MP. Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension. *Cytology.* 2009; 51 (1): 5–11.

*Матеріал надійшов до редакції 14.03.2014*