УДК: 612.015:57.032:576.535

Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ФІБРОБЛАСТОПОДІБНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ПІД ВПЛИВОМ СІРКОВОДНЮ

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України

Плотнікова Л.М., Березовський В.Я. Морфологічні зміни фібробластоподібних клітин людини під впливом сірководню // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 2. – С. 62-65.

В експериментах на мезенхімальних стромальних клітинах (МСК) лінії 4BL людини, виділених із периферійної крові, досліджували вплив донора сірководню – NaHS – на морфологію та проліферацію клітин. Показано, що типова для контрольного зразка веретеноподібна форма клітин змінювалась на округлу при культивуванні з NaHS (10-8-10-10 М). На четверту добу вирощування МСК після додавання у живильне середовище NaHS спостерігали появу фібробластоподібних клітин з відростками. Вони контактували з поверхнею сусідніх клітин. Встановлено, що донор сірководню в межах досліджуваних концентрацій знижує проліферативну активність та гальмує утворення міжклітинних контактів веретеноподібних клітин.

Ключові слова: культура клітин, сірководень, проліферація.

Плотникова Л.Н., Березовский В.А. Морфологические изменения фибробластоподобные клеток человека под влиянием сероводорода // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 2. – С. 62-65.

В опытах на мезенхимальных стромальных клетках (МСК) линии 4BL человека, выделенных из периферической крови, исследовали влияние донора сероводорода – NaHS – на морфологию и пролиферацию клеток. Показано, что типичная для контрольного образца веретенообразная форма клеток менялась на округлую при культивировании с NaHS (10-8-10-10 М). На четвертые сутки выращивания МСК после добавления в питательную среду NaHS наблюдали появление фибробластоподобных клеток с отростками. Они контактировали с поверхностью соседних клеток. Установлено, что донор сероводорода в пределах исследуемых концентраций снижает пролиферативную активность и тормозит образование межклеточных контактов веретенообразных клеток.

Ключевые слова: культура клеток, сероводород, пролиферация.

Plotnikova L.N., Berezovskii V.A. The human fibroblast-like cells morphological changes after the hydrogen sulfide influence // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 2. – С. 62-65.

In experiments on the human mesenchymal stromal cell (MSC) lines 4BL isolated from peripheral blood, we studied the effects of hydrogen sulfide donor – NaHS – on the morphology and cell proliferation. We found that for typical control sample fusiform cells changed to a rounded when cultured with NaHS (10-8-10-10 M). On the fourth day of cultivation MSC in medium with NaHS we observed the appearance of fibroblast-like cells with spikes. They are contact with the surface of neighboring cells. We established that the hydrogen sulfide donor within the studied concentration decreases proliferative activity and inhibits the formation of intercellular contacts spindle cells.

Key words: cell culture, hydrogen sulfide, proliferation.

Вступ. Сірководень (H_2S) разом із оксидом азоту (NO) і монооксидом вуглецю (CO) належить до групи газових трансмітерів. Ендогенний H_2S синтезується з L-цистеїну в тканинах організму за допомогою цистатіонін-β-синтази, цистатіонін-γ-ліази та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази [17, 18]. Відомо, що H_2S є важливою сигнальною молекулою, яка бере участь у регуляції судинного тонусу, передачі нервових імпульсів, опосередковує цитопротекцію на моделях ішемічно-реперфузійного пошкодження міокарда [3, 7, 11]. До молекулярних механізмів дії даного газотрансмітера відносять регуляцію відкривання АТФ-залежних калієвих ($K_{АТФ}$) каналів, підтримку SH-груп білків у відновленому стані, транспорт цистеїну у клітини і синтез відновленого глутатіону, реакції з активними формами кисню і азоту [2, 15]. Зазвичай дослідження проводять на тваринах (щури, кролі, миші), органах і тканинах (головний мозок, міокард, легені, нирки, печінка, скелетний м'яз), ізольованих органелах (мітохондрії). Висновки цих робіт неоднозначні, що може бути пов'язано з різними умовами проведення експерименту, а саме: типом досліджуваних клітин, концентрацією і часом впливу газового трансмітера на культуру [9, 10, 14].

Метою даної роботи було дослідити вплив донора сірководню на морфологію та проліферацію фібробластоподібних клітин людини.

Матеріали і методи. Мезенхімальні стромальні клітини (МСК) лінії 4BL − це фібробластоподібні клітини, отримані з периферійної крові здорового донора у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [5, 6]. Клітини культивували в умовах CO_2-інкубатора (5% CO_2, 37°C) у середовищі DMEM («Sigma», США) із додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби («Sigma», США), 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Донором сірководню у живильному середовищі був гідросульфід натрію (NaHS, «Sigma», США) у трьох різних концентраціях: 10^{-8}, 10^{-9} ,10^{-10} М.

Морфологічні зміни оцінювали візуально під мікроскопом Jenaval ("Carl Zeiss", Німеччина). Знімки отримували за допомогою фотоапарата Canon PowerShot 640A, приєднаного до мікроскопу. МСК фіксували і фарбували за ме-

тодом Романовського-Гімзи [4].

Для визначення проліферативної активності культуру досліджуваної лінії розсівали по 50 тис. клітин у скляні чашки Петрі (Ø 35 мм). Клітини ферментативно знімали за допомогою суміші 0,25% розчину трипсину і 0,02% ЕДТА (pH 7,5) (1:1) на третю й четверту добу культивування та підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва [1].

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою програми Microsoft Excell 2003 та програми OriginPro 7,5. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними зразками оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті культивування МСК лінії 4BL людини у присутності донора сірководню NaHS спостерігали значні морфологічні відмінності. Клітини контрольної групи характеризувалися фібробластоподібною формою (довжиною 50-100 мкм) з округлим ядром (рис. 1). Вони мали відростки, за допомогою яких контактували між собою з утворенням сітки. З невисокою частотою зустрічались подібні до трикутника більш розпластані МСК, або округлі клітини, які відкріплювались від поверхні та переходили у суспензію. У деяких зразках у культурі з'являлися клітини-гіганти (200 мкм). Клітини дослідженої культури при підвищенні конфлюентності схильні до подовження, стоншення та набуття щільного моношару.

На третю добу культивування МСК у присутності NaHS (10^{-8}-10^{-10} М) клітини набували атипової форми (рис. 1, в, д, ж). Вони втрачали відростки та округлювалися. Розташовувалися поодиноко або невеликими групами з 4-8 клітин. На четверту добу – вирізнялися плоскі веретеноподібні клітини з довгими відростками, які контактували з поверхнею сусідніх клітин (рис. 1, г, е, з). Вони утворювали ділянки моношару з 10-20 клітин. Половина клітин морфологічно залишалась округлої форми.

Слід зазначити, що міжклітинні взаємодії відіграють важливу роль у фізіологічних функціях організму. Було показано, що у спільній культурі між мультипотентними МСК людини і диференційованими соматичними клітинами (ембріональними кардіоміоцитами, епітеліоцитами нирки) щура утворюються міжклітинні контакти, зокрема щілинні контакти та тунельні нанотрубочки (ТНТ). По цим контактам здійснюється міжклітинне перенесення цитоплазматичних і мембранних компонентів та органел, зокрема мітохондрій. У МСК в умовах сокультивування з соматичними клітинами запускається диференціювання по кардіо- або нефроспецифічному шляху. Цей процес значною мірою залежить від наявності специфічних контактів між клітинами. Мультипотентні МСК в умовах монокультури також утворювали ТНТ. Причому, якщо порівнювати кількість ТНТ-утворюючих клітин у монокультурах МСК і кардіоміоцитів, вона буде приблизно однаковою; тоді як у монокультурі нирки таких клітин мало. Отримані дані підтвердили утворення міжклітинних контактів по типу ТНТ (0,1 мкм в діаметрі) поряд з іншими типами цитоплазматичних тяжів (~ 3 мкм), що з'єднують клітини при сумісному культивуванні [16].

Морфогенетичні взаємодії клітин в організмі значною мірою відтворюються на культурах клітин різних типів, зокрема, епітеліоцитах і фібробластах. Культивовані клітини взаємодіють між собою за допомогою рецепторів і лігандів, які активують внутрішньоклітинні сигнальні системи. Роль лігандів грають три групи компонентів мікросередовища – рідке середовище, позаклітинний матрикс і міжклітинні контакти. До лігандів рідкого середовища відносяться гормони, фактори росту, фактори апоптозу та інші молекули. Прикріплюючись до матриксу, клітина розпластується, її форма зі сферичної перетворюється на пласку. Зустріч двох фібробластів або двох епітеліоцитів призводить до місцевого інгібування псевдоподіальної активності – так званому контактному паралічу. Клітини того самого типу в тканині взаємодіють одина з одною і погоджують швидкість розмноження, щоб підтримувати належну щільність популяції. «Соціальний» контроль такого роду чітко проявляється при реакціях на пошкодження. Наприклад, коли ушкоджено епітелій, клітини по краях рани стимулюються до поділу й переміщуються на оголену поверхню доти, поки вона знову не буде закрита. На цьому етапі відбувається контактне гальмування проліферації й рух клітин припиняється. Подібне явище можна спостерігати на дисоційованих клітинах у культурі. Епітеліальні клітини або фібробласти, засіяні у чашку Петрі, будуть адгезуватися до поверхні, розпластуватися й ділитися доти, поки не утвориться суцільний моношар, у якому сусідні клітини налагоджують тісні взаємозв'язки [8]. Слід зауважити, що вирощені in vitro клітини у моношарі поводяться і спілкуються одина з одною не зовсім так, як in vivo, тобто в умовах багатоклітинного організму. Однак, вивчати поведінку клітин у монокультурі набагато легше і зручніше, ніж у фізіологічних умовах живого організму. Проте, екстраполяція отриманих результатів до умов цілісного організму – це питання окреме, і в багатьох випадках потребує додаткових досліджень.

На третю добу культивування при NaHS кількість клітин була 10-16 тис кл/мл, а у контролі – 181,5 тис кл/мл. Через 96 годин культивування в дослідних варіантах у середньому на чашках Петрі виросло 37-47 тис кл/мл, у контролі кількість клітин збільшилась до 379,5 тис кл/мл. Таким чином, донор сірководню в межах досліджуваних концентрацій знижував проліферативний потенціал клітин людини лінії 4BL всередньому на 90%. Це явище, ймовірно, пов'язано з цитотоксичною дією газотрансмітера. H_2S є ліпофільною молекулою, що може вільно проникати через плазматичну мембрану клітини та інгібувати клітинне дихання, послаблюючи активність цитохром-с-оксидази електронно-транспортного ланцюга мітохондрій.

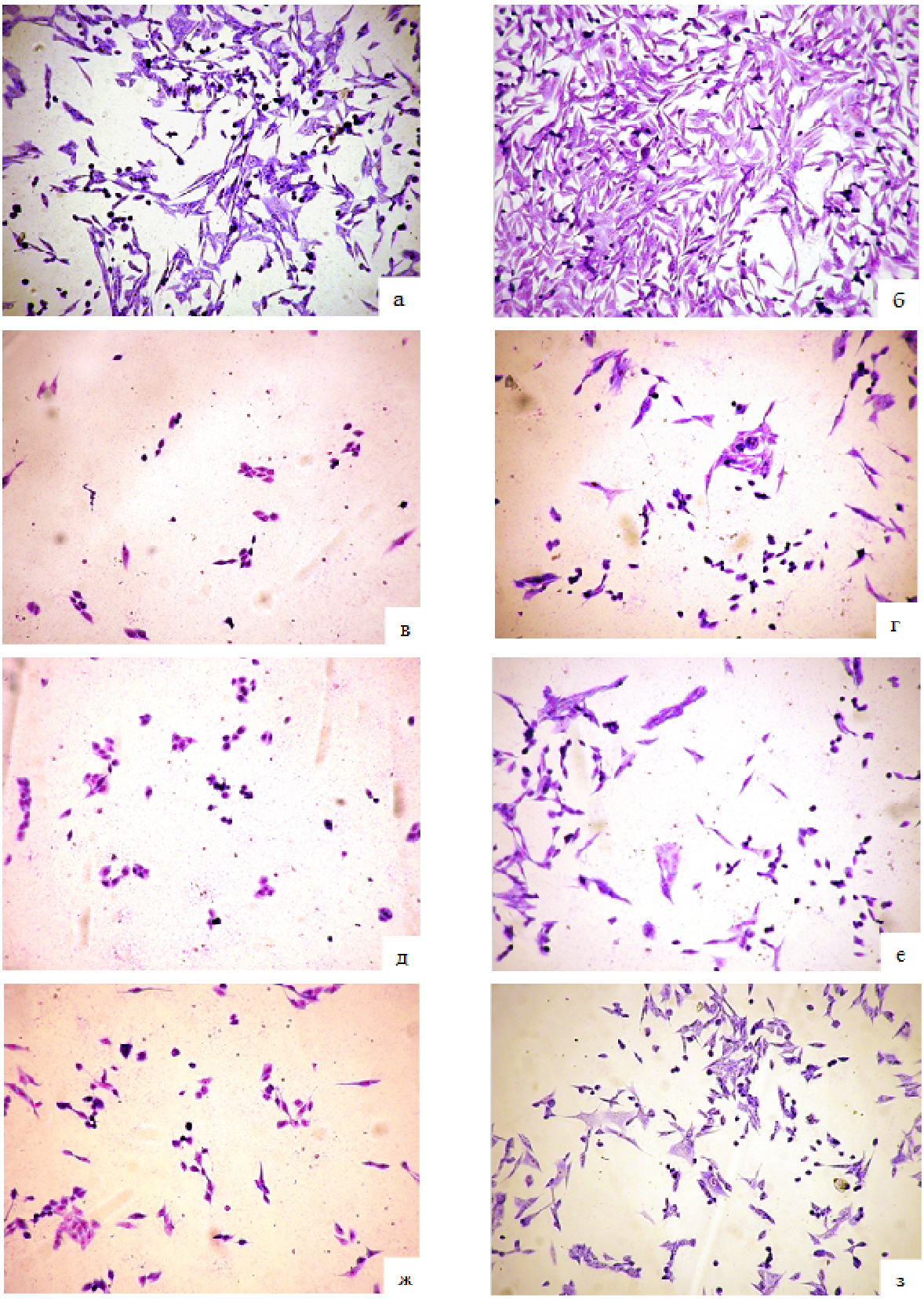

Рис. 1. Морфологія МСК лінії 4BL контрольної групи (а, б) та після впливу різних концентрацій NaHS: 10-8 М (в, г), 10-9 М (д, е), 10-10 М (ж, з) на третю (а, в, д, ж) і четверту добу культивування (б, г, е, з). Фарбування за Романовським-Гімзою. Зб. ×100.

Показано, що проліферативна активність фібробластоподібних мезенхімальних стромальних клітин лінії 4BL людини при додаванні донора сірководню (10^{-8}-10^{-10} М) вірогідно знижувалася відносно контрольних значень (рис. 2).

Ендогенний або екзогенний сірководень здат-

ний регулювати ріст клітин. Giuliana Gobbi і співавтори показали, що екзогенний сірководень знижує клональний ріст, проліферацію і клітинну адгезію кератиноцитів людини in vitro. На молекулярному рівні H_2S знижує Raf / MAPK (mitogen-activated protein kinase) / ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) сигнальних шляхів. Зниження адгезії в оброблених гідросульфідом натрію клітин (2 mM NaHS, 24-48 год) пов'язані з пригніченням експресії β4, α2 і α6 інтегринів, які необхідні для сприяння клітинної адгезії, а також антиапоптоза і проліферативної сигналізації нормальних кератиноцитів [13]. Показано, що певні дози донора сірководню NaHS (10-75 mM, 12-48 год) викликають ушкодження ДНК і змінюють експресію генів апоптозу в легеневих фібробластах організму людини [12].

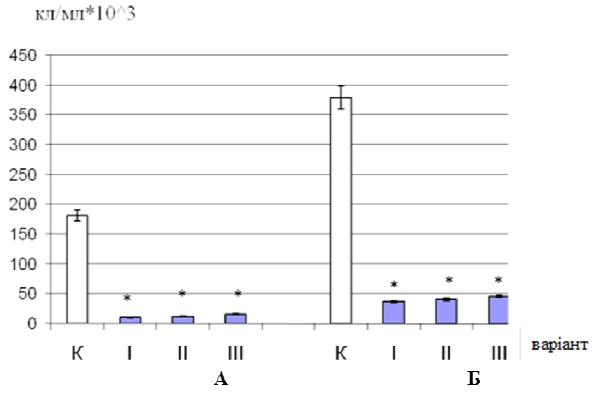

Рис. 2. Проліферативна активність клітин лінії 4BL контрольних (К) і дослідних (I – 10-8 M NaHS, II – 10-9 M NaHS, III – 10-10 M NaHS) варіантів на третю (а) та четверту (б) добу культивування. *p<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем.

Таким чином, результати наших досліджень свідчать, що донор сірководню у концентрації 10^{-8}-10^{-10} М здатний впливати не тільки на проліферацію фібробластоподібних клітин, але і на їх морфологію. Культивування мезенхімальних стромальних клітин людини лінії 4BL з NaHS призводить до появи атипових клітин та істотно знижує швидкость їх проліферації.

Висновки:

1. Веретеноподібні мезенхімальні стромальні клітини при додаванні у живильне середовище гідросульфіду натрію (10^{-8}-10^{-10} М) змінюють свою морфологічну форму на округлу та втрачають відростки.
2. Донор сірководню NaHS (10^{-8}-10^{-10} М) пригнічує проліферативну активність клітин лінії 4BL людини.
3. Присутність донора сірководню NaHS у досліджуваних концентраціях на початкових етапах культивування фібробластоподібних клітин гальмує утворення відростків та міжклітинних контактів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. – М.: Мир, 1983. – 264 с.
2. Березовський В.Я. Роль ендогенного сірководню в регуляції фізіологічних функцій організму / В.Я. Березовський, Л.М. Плотнікова // Медична гідрологія та реабілітація. – 2013. – Т.11, №1. – С. 115-120.
3. Березовський В.Я. Сірководень та його роль у регуляції судинного тонусу / В.Я. Березовський, Л.М. Плотнікова // Медична гідрологія та реабілітація. – 2012. – Т.10, №1. – С. 4-10.
4. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой / Волкова О.В., Елецкий Ю.К.. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
5. Дослідження каріотипу нової лінії клітин людини 4BL6 при тривалому культивуванні in vitro / В.О. Кушнірук, Т.П.Кочубей, Л.Л. Мацевич, та ін. // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2012. – Т.3. – С. 313-318.
6. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека in vitro / Л.Л. Лукаш, А.П. Яцишина, В.О. Кушнирук, О.В. Пидпала // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – Т.11. – С. 493-498.
7. Резник Н. Л. Третий газ: сульфид водорода как нейротрансмиттер / Н. Л. Резник // Химия и жизнь. – 2009. – Т.10. – С. 24-29.
8. Самойлов В.И. Механизмы социального поведения тканевых клеток позвоночных: культуральные модели / В.И. Самойлов, Ю. М. Васильев // Журнал общей биологии. – 2009. – Т.70, № 3. – С. 239-244.
9. Вплив донора сірководню NaHS на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів / О.М. Семенихіна, Н.А. Струтинська, А.Ю. Будько, та ін. // Фізіол. журн. – 2013. – Т.59, №2. – С. 9-17.
10. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці щурів зі спонтанною гіпертензією / Н.А. Струтинська, Н.О. Дорофієва, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2013. – Т.59, №1. – С. 3-10.
11. Вплив сірководню на реакції ізольованого серця щурів при навантаженні об'ємом і ішемії–реперфузії / Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська, О.М. Семеніхіна, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2012. – Т.58, №6. – С. 57-66.
12. Baskar R., Li L., Moore1 P. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and change in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells // The FASEB Journal. – 2007. – V.21. – P. 247-255.
13. Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogen-activated protein kinase signaling / G. Gobbi, F. Ricci, Ch. Malinverno et al. // Laboratory Investigation. – 2009. – V.89. – P. 994-1006.
14. Hydrogen sulfide, a gaseous transmitter, stimulates proliferation of interstitial cells of Cajal via phosphorylation of AKT protein kinase / Y. Huang, F. Li, W. Tong, et al. // Tohoku J Exp. Med. – 2010. – V.221(2). – P. 125-132.
15. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H2S) – the third gas of interested for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacol. Rep. – 2007. – V.59. – P. 4-24.
16. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromalcells and renal tubular cells in coculture / E.Y. Plotnikov, T.G.Khrvapenkova, S.I. Galkina, et al. // Experimental Cell Research. – 2010. – V.316. – P. 2447-2455.
17. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain / N. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida et al. // Antioxid. Redox. Signal. – 2009. – V.11. – P. 703-714.
18. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ-lyase / G. Yang, L.Wu, B. Jiang et al. // Science. – 2008. – V.322. – P. 587-590.

Надійшла 24.02.2014 р.
Рецензент: доц. В.А. Пастухова