

Морфофункциональные свойства стромальных стволовых клеток при культивировании *in vitro* в динамических условиях

Запускалов И.В.¹, Кривошеина О.И.¹, Хлусов И.А.^{1,2}, Мартусевич Я.А.¹, Шевцова Н.М.¹, Зайцев К.В.², Кочмала О.Б.¹

Morphofunctional properties of stromal stem cells incubating *in vitro* under dynamic conditions

Zapuskalov I.V., Krivosheina O.I., Khlusov I.A. Martusevich Ya.A., Shevtsova N.M., Zaytsev K.V., Kochmala O.B.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Томский филиал ФГУ «РНЦ „ВТО“ им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий», г. Томск

© Запускалов И.В., Кривошеина О.И., Хлусов И.А. и др.

Проведено культивирование стромальных клеток в динамических и стационарных условиях в течение 24–48 ч. Исследована их внутриклеточная ферментативная активность с помощью цитохимических методов — окраски на щелочную фосфатазу и неспецифическую эстеразу. В условиях динамического культивирования активность щелочной фосфатазы была выше по сравнению со стационарными условиями, что свидетельствует об ускорении дифференцировки и созревания стромальных клеток человека.

Ключевые слова: культивирование, стромальные клетки, ферментативная активность, однонаправленный поток жидкости.

The culture of stromal stem cells was incubated under constant and dynamic conditions. The incubation period was lasting 48 h. Intracellular enzyme activity of stromal stem cells were carried out with cytochemical methods. Alkaline phosphatase activity was increased under dynamic conditions, differentiation of stromal stem cells being accelerated comparatively steady-state conditions.

Key words: stromal stem cells, incubate, dynamic conditions, intracellular enzyme activity, alkaline phosphatase.

УДК 576.31:57.085.23

Введение

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) рассматривают как клетки с фибробластоподобной морфологией. Несмотря на многочисленные исследования, большинство сторон биологии ММСК до сих пор остаются не изученными [8]. При этом только функциональные пробы, такие как определение активности щелочной фосфатазы, позволяют охарактеризовать процессы созревания ММСК, прежде всего в остеогенном направлении [3].

Ни один из антигенных маркеров и секретруемых цитокинов не может быть надежным

параметром для анализа чистоты культуры ММСК. С одной стороны, даже долгосрочные культуры могут показать некоторую разнородность (возможно, из-за связанной с клеточным циклом экспрессии маркера), с другой стороны, функционально различные клеточные культуры могут иметь сходные иммунофенотипические профили [15].

В настоящее время *in vitro* достигнуты значительные успехи в индукции созревания и дифференцировки ММСК в различных направлениях, демонстрирующие широкие возможности для развития клеточных технологий. Описаны метаболические (посредством регуляторных

молекул, например дексаметазона и бета-глицерофосфата) [1, 10] и биофизические (посредством структурных свойств естественного и искусственного микроокружения) [7] способы регуляции функциональной активности ММСК.

Ранее было установлено воздействие однонаправленного потока жидкости, имитирующего *ex vivo* ее движение в организме, на проявление фибробластидных морфофункциональных свойств мононуклеарами периферической крови человека [2], предположительно относящихся к циркулирующему пулу колониобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) [5].

Цель исследования — экспериментальное подтверждение возможности ускоренного созревания стромальных стволовых клеток человека в гидродинамических условиях.

Материал и методы

В качестве источника стромальных стволовых клеток применяли культуру фибробластидных клеток легкого человека (ООО «Банк стволовых клеток», г. Томск) (рис. 1). Препараты после 4–5 пассажей представляют собой морфологически и функционально (на 88%) однородную популяцию клеток с ограниченным сроком жизни, сохраняющую при пассажах стабильный кариотип, и онкогенно безопасную. Клетки свободны от посторонних вирусных (ВИЧ, гепатит, герпес и др.) и бактериальных (*Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* и др.) агентов. Жизнеспособность клеток, определяемая согласно ISO 10993-5 по исключению окрашивания в тесте с 0,4%-м трипановым синим, составила 91–93%. При культивировании в течение 4–8 сут клетки проявляли фибробластидную морфологию (рис. 1), секретировали в культуральную среду щелочную и кислую фосфатазы, остеокальцин, что подтверждает их принадлежность к пулу ММСК.

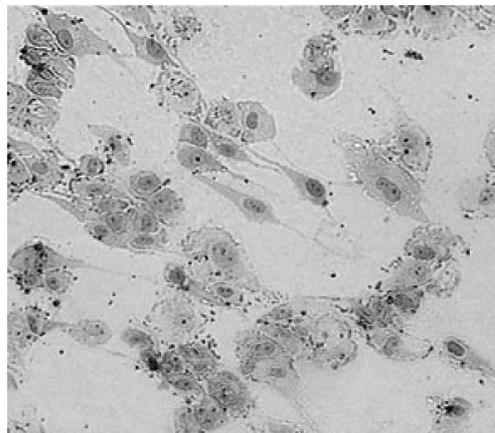


Рис. 1. Культура фибробластов легкого человека на пластике.

Окраска азуром II-эозином. Ув. 400

Культуру клеток в концентрации $5 \cdot 10^4$ кл./см² клонировали в течение 24–48 ч при температуре 37 °С в чашках Петри диаметром 35 мм (стационарная культура) и в системе, моделирующей однонаправленное движение питательной среды (динамическая культура). Предварительно в чашки Петри помещали фильтр, аналогичный таковому в проточной системе. Проточная система, как описано ранее [2], представляет собой замкнутую систему с камерой, содержащей полупроницаемый фильтр. Камера соединяется с емкостью, заполненной питательной средой, роликовым насосом, который снабжен поддерживающим клапаном, и обеспечивает равномерное однонаправленное движение среды. Камера снабжена боковым клапанным отверстием для введения клеточного материала; полупроницаемый фильтр служит местом для его размещения. Аппарат «Аспиратор-01» работал в постоянном режиме со скоростью 1–2 мм³/мин. Данная скорость выбрана на основании экспериментальных исследований и является оптимальной: скорость меньшей величины недостаточна для достижения поставленной цели, большая скорость ведет к механическому повреждению клеток.

В качестве культуральной среды применяли ДМЕМ в модификации Искова объемом 200 мл, в которую добавляли гентамицин из расчета 50 мг/л.

По окончании культивирования фильтры извлекали, сушили на воздухе, клеточный материал фиксировали в течение 30 с в парах формалина, окрашивали на щелочную фосфатазу и неспецифическую эстеразу [6].

Просмотр и фотографирование результатов окраски на прозрачных подложках проводили с помощью персонального компьютера IBM PC Pentium, цифрового фотоаппарата Epson (Япония) и микроскопа фирмы Karl Zeiss Jena (Германия). Морфологию поверхности гибридных имплантатов (фильтр и окрашенные клетки) исследовали в материаловедческом центре коллективного пользования при Томском государственном университете (г. Томск). Оптическую микроскопию непрозрачных объектов проводили в отраженном свете на металлографическом микроскопе Olympus GX-71 (Япония) при увеличении 400.

Методом компьютерной морфометрии цифровых изображений [1] с использованием программы PhotoShop 6.0 определяли число, площадь окрашенных клеток и их оптическую плотность.

Статистическую обработку выполняли с применением программ Statistica for Windows 6.0, Microsoft Excel 2002. Для описания изменчивости количественных признаков использовали общепринятые статистические процедуры, включая расчет параметров распределений (средние значения, их ошибки, дисперсии). Проверку на нормальность распределений осуществляли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова.

В выборках наблюдалось распределение показателей, отличное от нормального. В связи

с этим для оценки статистической значимости различий выборки применяли непараметрический Z-критерий Вилкоксона. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

При культивировании стромальных клеток в стационарных условиях (в чашках Петри) на протяжении всего периода наблюдений (1–2 сут) цитохимически в них отмечалась активность неспецифической эстеразы (НЭ) (таблица, рис. 2)). При этом с увеличением срока исследования незначительно повышалась плотность распределения клеток на искусственной поверхности, их оптическая плотность, однако средняя площадь ферментативной окраски статистически значимо уменьшалась (на 31%; $p = 0,00001$). Щелочная фосфатаза (ЩФ) в клетках, культивируемых в стационарных условиях, не выявлялась.

В проточной культуре количество клеток на фильтрах, окрашенных НЭ, оказалось существенно сниженным (практически в 10 раз и более) по сравнению с обычным ведением культуры (см. таблицу). Однако ко 2-м сут эксперимента статистически значимо повышалось восприятие красителя для ЩФ (см. таблицу). Позитивно окрашенные клетки имели большую по сравнению с окраской на НЭ площадь, неправильную форму, располагались, как правило, в углублениях поверхности (рис. 3).

Морфометрические показатели культуры клеток легкого человека при различных способах и времени краткосрочного культивирования в минимальной питательной среде

Исследуемый фермент (n = 10)	Срок исследования, сут	Метод культивирования клеток	Число окрашенных клеток в 1 мм ²	Площадь окраски, мкм ²	Оптическая плотность, усл. ед.
НЭ	1	Стационарный	45,74	119,77	22,56
		Проточный	Единичные	—	—
	2	Стационарный	63,75	82,55	26,98
		Проточный	6,77* 2,66; 0,007	69,98 1,36; 0,173	20,97 0,17; 0,86
ЩФ	1	Стационарный	0	0	0
		Проточный	Единичные	—	—
	2	Стационарный	0	0	0
		Проточный	9,56*	400,87*	14,67*

	Z; p	2,66; 0,008	3,18; 0,001	3,17; 0,002
--	------	-------------	-------------	-------------

Примечание. n – число просчитанных полей зрения на фильтре (для каждой группы использовали три фильтра); * – статистически значимые различия согласно Z-критерию Вилкоксона по сравнению со стационарным культивированием.

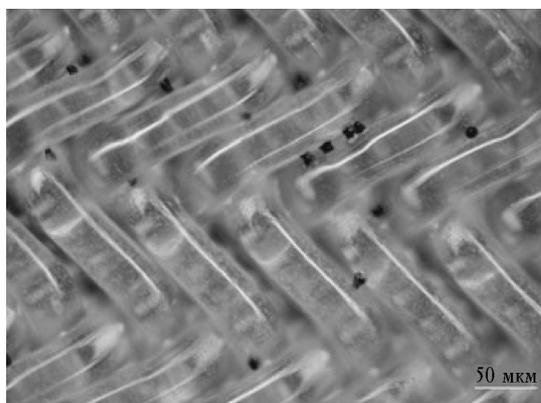


Рис. 2. Культура фибробластов легкого человека на фильтре, окрашенных на неспецифическую эстеразу. Ув. 400

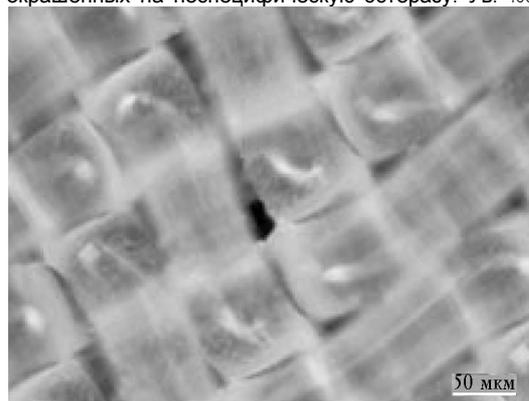


Рис. 3. Культура фибробластов легкого человека на фильтре, окрашенных на щелочную фосфатазу. Ув. 400

Обсуждение

Согласно определению И.Л. Черткова и соавт. (2005), «стволовость» — это способность к самоподдержанию популяции (при множественных ретрансплантациях), пролиферативный потенциал, достаточный для мультилинейного восстановления гемопоэза у животных с компрометированной кроветворной тканью (облучение, цитостатические препараты, генетические мутации, иммунодефицит) [8]. Основными свойствами стволовых клеток являются способность к самоподдержанию «стволовости», пла-

стичности, коммитированию с последующей дифференцировкой.

Таким образом, стволовые клетки проявляют себя только в процессе функционирования, поэтому на современном этапе знаний наиболее адекватными методами их обнаружения считаются функциональные, например цитохимические, пробы. Известно, что стромальные клетки (фибробласты, остеобласты), производные ММСК, позитивно окрашиваются на ЩФ [4, 5]. При этом активность ЩФ возрастает по мере их созревания [4]. КОЕ-Ф проявляют в динамике культивирования (созревания) фибробластоидный фенотип, активность ЩФ и отсутствие реакции на НЭ [12].

Вместе с тем молодые гранулоциты, эритроциты, мегакариоциты, лимфоциты и моноциты, производные стволовой кроветворной клетки (СКК), дают отрицательную реакцию на ЩФ. НЭ считается маркером макрофагов [6].

На границе раздела искусственного материала (имплантата) и клетки (ткани) происходят основные события, связанные с жизнедеятельностью стволовых клеток, образованием тканей на основе общебиологических процессов пролиферации, коммитирования, дифференцировки и созревания [13]. Наиболее распространены исследования ферментативной активности клеток при их прямом контакте с искусственными поверхностями [11], моделирующие местные реакции на имплантируемые изделия. Определенная тропность ММСК к искусственным подложкам показана в работе J.M. Vehof и соавт. [15].

Ведение культуры фибробластоидных клеток легкого человека на фильтрах в стационарных условиях показало, что в них проявляется активность НЭ при размерах и форме клеток, соответствующих кроветворным элементам. В динамике эксперимента снижалась площадь окраски на НЭ и несколько возрастала оптическая плотность клеток, что свидетельствует, по видимому, о принятии ими округлой формы

(рис. 2). Таким образом, в культуре стромальных клеток присутствует примесь элементов из пула СКК, которые получают преимущества для созревания. Согласно собственным данным, эта примесь может достигать 12%, что было установлено в отдельном эксперименте по наличию в супернатанте ЩФ, не принадлежащей к фракции костного изофермента, синтезируемого, как известно, остеобластами [3].

При биомеханическом (гидравлическом) воздействии однонаправленного тока жидкости клетки приобретали преимущественно фибробластоидный фенотип (см. таблицу, рис. 3): неправильная форма, увеличение площади окраски на ЩФ вследствие прилипания к поверхности. Обращает на себя внимание факт ускорения дифференцировки и созревания клеток при динамическом культивировании (48 ч) в сравнении со стационарным способом. Например, известно, что оптимальный срок стандартного культивирования КОЕ-Ф человека составляет 7–14 сут [1, 5].

Данные, полученные при культивировании стромальных клеток легкого человека в проточных условиях, принципиально согласуются с результатами исследования культуры мононуклеарных клеток периферической крови [2]. Обнаруженный феномен является скорее всего общебиологической закономерностью.

При этом постановка эксперимента, в частности отсутствие в культуральной среде ключевых питательных добавок, стимулирующих жизнедеятельность клеток, позволяет говорить о дифференцированном значении потока жидкости для процессов их созревания.

Возможно, обеспечивая динамическое напряжение цитоскелета, пространственно-временную ориентацию клеток, направленный поток жидкости тем самым оказывает биомеханическое формообразующее влияние на морфофункциональные особенности культивируемых клеток. Прилипшие к трехмерной матрице клетки-предшественники, находясь на пути движения питательной среды, претерпевают серию трансформаций, в ходе которых проявляется активность разных ферментных систем. По крайней мере, влияние цитоскелета на измене-

ние функциональной активности клеток не вызывает сомнений, обсуждаются механизмы структурно-функционального опосредования внеклеточных сигналов [9].

Заключение

Наряду с известными способами регуляции функциональной активности ММСК (биологически активные молекулы, биосовместимые поверхности) доказана возможность ускорения дифференцировки и созревания стромальных стволовых клеток человека посредством биомеханического воздействия однонаправленного потока жидкости. Подобная технология может иметь как фундаментальное значение, связанное с изучением механизмов модификации морфофункциональных свойств клеток, так и практический выход, позволяющий наращивать массу дифференцированных клеток посредством технологии «биореактор *in vitro*».

Исследование выполнено при поддержке федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг.» ГК № 02.512.11.2285 от 10.03.2009).

Литература

1. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова. Томск: СТТ, 2004. 386 с.
2. Кривошеина О.И., Запужалов И.В., Хлусов И.А. Морфофункциональные особенности мононуклеарных элементов крови при культивировании *in vitro* в динамических условиях // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2005. Т. 139, № 3. С.357–360.
3. Риггз Б.Л., Мелтон Л.Дж. III. Остеопороз: пер. с англ. СПб.: БИНОМ; Невский диалект, 2000. 560 с.
4. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина, 1981. 312 с.
5. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М.: Медицина, 1980. 216 с.
6. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 320 с.
7. Хлусов И.А., Карлов А.В., Шаркеев Ю.П. и др. Остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток костного мозга *in situ*: роль физико-химических свойств искусственных поверхностей // Клеточ. технологии в биологии и медицине. 2005. № 3. С. 164–173.

Запускалов И.В., Кривошеина О.И., Хлусов И.А. и др. Морфофункциональные свойства стромальных стволовых клеток...

8. **Чертков И.Л., Дризе Н.И., Воробьев АИ.** Схема кроветворения // *Терапевт. арх.* 2005. № 7. С. 5–12.
9. **Biomaterials** science: an introduction to materials in medicine / Ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen et al. 2nd ed. Elsevier Inc., 2004. 851 p.
10. **Bone** tissue engineering in polymeric and ceramic biomaterials / J.D. de Bruijn, D. Dekker, I. van der Brink [a. o.]. 23rd Annual Meeting of the Society for Biomaterials, April 30 – May 4, New Orleans, Louisiana, USA, 1997. P. 51.
11. **De Santis D., Guerriero C., Nocini P.F. et al.** Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxylapatite discs // *J. Sci. Mater. Med.* 1996. V. 7, № 1. P. 21–28.
12. **Friedenstein A.J.** Osteogenic stem cells in bone marrow // Heersche J.N.M., Kanis J.A. eds. Bone and mineral research. The Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1990. P. 243–272.
13. **Khlosov I.A., Zagrebin L.V., Shestov S.S., Naumov S.A.** Physical-chemical manipulations with microbial and mammalian cells: from experiments to clinics // *Stem Cell Applications in Disease and Health* / Ed. W.B. Burnside and R.H. Ellsley. N.Y.: Nova Science Publishers Inc, 2008. P. 37–80.
14. **Nardi N.B., Meirelles L.S.** Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2006. № 174. P. 249–282.
15. **Vehof J.M., Mahmood J., Takita H. et al.** Ectopic bone formation in BMP-coated calcium phosphate-coated titanium mesh // Sixth world biomaterial congress, 15–20 May 2000. Hawaii, USA, 2000. P. 640.

Поступила в редакцию 29.04.2009 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

Сведения об авторах

И.В. Запускалов – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой офтальмологии СибГМУ (г. Томск).

О.И. Кривошеина – д-р мед. наук, профессор кафедры офтальмологии СибГМУ (г. Томск).

И.А. Хлусов – д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

Я.А. Мартусевич – аспирант кафедры офтальмологии СибГМУ (г. Томск).

Н.М. Шевцова – д-р мед. наук, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ (г. Томск).

К.В. Зайцев – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии и биомеханики имплантируемых устройств Томского филиала ФГУ «РНЦ „ВТО“ им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий» (г. Томск).

О.Б. Кочмала – соискатель кафедры офтальмологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Мартусевич Яна Александровна, тел. 8-913-817-9205, e-mail: martusyana@yandex.ru