

МОДЕЛЬ ВЛИЯНИЯ ГИПОКСИИ НА КЛЕТОЧНУЮ СОСТАВЛЯЮЩУЮ И СИНТЕЗ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ

© 2019 г. Ю. Г. Суховой¹, Е. Г. Костоломова^{1,2*}, И. Г. Унгер¹,
Т. В. Акунеева¹, И. А. Аптекарь³

*E-mail: lenakost@mail.ru

¹ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

²ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

³АНО «Тюменский институт мануальной медицины», Тюмень, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 29.03.2019

Установлено, что культивирование фибробластов в условиях гипоксии приводит к снижению их морфологической гетерогенности, повышению пролиферативной активности и жизнеспособности клеток. Вызывает угнетение синтеза компонентов внеклеточного матрикса (коллагена и эластина) и снижение экспрессии рецептора гиалуроновой кислоты (CD44). Длительность гипоксии обуславливает степень снижения.

Ключевые слова: гипоксия, фибробласты, проточная цитометрия, коллаген, эластин

DOI: 10.31857/S102872210006535-3

Адрес: 625027, Тюмень, ул. Котовского, 5. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Костоломовой Елене Геннадьевне. Тел.: +7 904 493 06 74
E-mail: lenakost@mail.ru

Авторы:

Суховой Ю. Г., д.м.н., профессор, директор ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Костоломова Е. Г., к.б.н., ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

Унгер И. Г., к.м.н., в.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Акунеева Т. В., с.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Аптекарь И. А., к.м.н. директор АНО «Тюменский институт мануальной медицины», Тюмень, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Влияние гипоксии на клетки широко изучается [1]. Но важно не только состояние клеточных элементов, но и внеклеточного матрикса (содержание коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты).

Цель исследования: изучить изменения морфофункциональной активности фибробластов и продукцию ими компонентов внеклеточного

матрикса при моделировании различных режимов гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичную культуру дермальных фибробластов получали из биоптатов кожи путем механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки. Стандартное культивирование проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ с использованием CO₂-инкубатора (Sanyo, Япония). Для создания пониженного содержания кислорода в среде использовали CO₂-инкубатор и герметичную камеру (StemCell Technologies, США), модифицированную датчиками давления и концентрации O₂, которую продували газовой смесью (95% N₂, 5% CO₂) до установления 0% концентрации кислорода. В работе использовали клетки 4–6 пассажа. Каждый эксперимент воспроизводился 15 раз с дублированием аналитических измерений. Прижизненную визуализацию фибробластов, жизнеспособность клеток, окрашенных трипановым синим проводили с помощью микроскопа СКХ-41 (Olympus, Япония). Контроль за процессами апоптоза и некроза проводили, оценивая количество

апоптотических и некротических клеток и фазы клеточного цикла определяли методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Иммунофенотипирование культивируемых фибробластов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) с помощью моноклональных антител CD29, CD44, CD90, CD105, CD34, CD45, CD31, HLA-DR [2]. Пролиферативную активность изучали по времени удвоения популяции клеток и состоянию их клеточного цикла [3]. Способность фибробластов к продукции коллагена первого типа (COL1) и эластина определяли в супернатанте после каждого пассажа методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем (Cloud-Clone Corp., USA) по методике производителя.

Моделирование гипоксии

Экспозицию фибробластов в среде с измененным газовым составом осуществляли однократно в течение: 1 часа, 12 часов и 24 часов. Затем клетки культивировали в стандартных условиях при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ с использованием CO₂-инкубатора в течение 1, 12, 24, 48, и 72 часов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ «Excel» и «Statistica 7.0» для WinXP. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни при выбранном уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения эксперимента в работу были взяты клетки 6 пассажа с высокой функциональной активностью (максимальный из 18 пассажей уровень выработки коллагена и эластина). Полученная клеточная популяция гетерогенна, так как выделенные фибробласты находятся на разных стадиях развития (небольшие веретеновидные активно делящиеся клетки-предшественники более крупные веретеновидные созревающие клетки; крупные плащевидные зрелые фиброциты). По результатам анализа выявлено, что основной пул клеток в культуре находится в G0-фазе, что соответствует характеристике дифференцированных фибробластов. Индекс ДНК в среднем составил 1,96, что характеризует нормально развивающуюся культуру. Субпопуляционный состав культуры фибробластов

характеризовался экспрессией мезенхимных (CD44, CD29, CD90, CD105) и отсутствием эпителиальных, гемопоэтических и лейкоцитарных маркеров (CD31, CD34, CD45, HLA-DR).

Результаты исследования показали, что наименее повреждающее действие на клетки оказывает гипоксия в течение 1 часа. Пониженное содержание кислорода вызывает в клетках слабый окислительный стресс, адаптация к которому, вероятно, приводит к повышению устойчивости клеток к моделируемому окислительному стрессу. Установлено, что при культивировании фибробластов в условиях гипоксии в течение 1 часа по сравнению с нормоксией наблюдается значительный прирост клеток: $91 \pm 5\%$ и $77 \pm 4\%$ в контроле соответственно. Кроме того, в условиях гипоксии наблюдаются антиапоптотический (% AnnV⁺ клеток: контроль $9,7 \pm 1,2\%$; гипоксия $4,5 \pm 1,3\%$) и антинекротический (% PI⁺ клеток: $3,6 \pm 1,2\%$ и $1,3 \pm 0,3\%$, соответственно) эффекты, что проявляется в повышении количества жизнеспособных фибробластов (AnnV-PI⁻: $91 \pm 2,39\%$ и $95,5 \pm 0,95\%$, соответственно).

При культивировании фибробластов в условиях гипоксии фенотипические особенности клеток сохраняются после часовой экспозиции культуры в условиях гипоксии, последующие 12- и 24-часовая экспозиции сопровождаются снижением доли клеток, экспрессирующих CD44 ($41 \pm 13\%$; $20 \pm 11\%$ и $90 \pm 7\%$ в контроле), не вызывая изменения количества клеток, экспрессирующих CD105, CD29 и CD90. Дальнейшее культивирование в условиях нормоксии не оказывает влияния на долю CD29⁺, CD105⁺ и CD90⁺ клеток и способствует восстановлению количества CD44⁺ до исходного уровня через 48 часов (12-часовая гипоксия) и через 72 часа (24-часовая гипоксия). Важным свойством, характеризующим функциональное состояние клеточной популяции, является синтез коллагена и эластина фибробластами. В контрольной группе содержание коллагена и эластина в супернатанте составило 364 ± 25 пг/мл и 270 ± 19 нг/мл соответственно. Кратковременная (1 час) гипоксия не оказывает значимого влияния на продукцию фибробластами коллагена и эластина в сравнении с контрольной группой (200 ± 16 пг/мл и 262 ± 25 нг/мл). Однако после помещения культуры в условия нормоксии (t 37 °С в атмосфере 5% CO₂) наблюдается резкое угнетение синтеза данных веществ с постепенным восстановлением их продукции до нормальных единиц после 48 часов культивирования. При более длительной гипоксии (12 часов) наблюдалось

значительное угнетение синтеза как коллагена ($19 \pm 1,5$ пг/мл), так и эластина ($8 \pm 0,4$ нг/мл) фибробластами. Последующее культивирование в нормальных условиях (95% воздуха + 5% CO₂) приводит лишь к умеренному восстановлению продукции фибробластами данных веществ.

После нахождения культуры фибробластов в условиях полной гипоксии в течение 24 часов происходит практически полное угнетение синтеза коллагена ($0,7 \pm 0,3$ пг/мл) и эластина ($1 \pm 0,2$ нг/мл) с последующим незначительным восстановлением продукции эластина и полным угнетением синтеза коллагена при культивировании в условиях нормоксии.

ВЫВОДЫ

Гипоксия вызывает изменение фенотипа клеток в культуре, а именно: снижение экспрессии рецептора гиалуроновой кислоты (CD44).

Длительность гипоксии влияет на степень угнетения экспрессии маркера CD44 (чем длительнее гипоксия, тем значительнее угнетение и длительнее восстановление).

Гипоксия оказывает влияние на продукцию фибробластами компонентов внеклеточного

матрикса – коллагена и эластина, обуславливая снижение выработки этих факторов тем сильнее, чем длительнее гипоксия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Шабанов П. Д., Зарубина И. В., Новиков В. Е., Цыган В. Н. Метаболические корректоры гипоксии. – СПб., 2010. – 916 с. [Shabanov P. D., Zarubina I. V., Novikov V. Ye., Tsygan V. N. Metabolicheskiye korrektery gipoksii. SPb., 2010. – 916 с.]
2. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315–7
3. Кудрявцев И. В., Хайдуков С. В., Зурочка А. В., Черешнев В. А. Применение метода проточной цитофлуориметрии для оценки пролиферативной активности клеток в медико-биологических исследованиях. *Российский иммунологический журнал*, 2012; 6(14), № 3–1:21–40. [Kudryavtsev I. V., Khaydukov S. V., Zurochka A. V., Chereshevnev V. A. Application of the method of flow cytometry for the estimation of proliferative activity of cells in medical and biological researches. *Russian journal of immunology*, 2012; 6(14), № 3–1:21–40].

MODEL OF INFLUENCE HYPOXIAS ON THE CELLULAR COMPONENT AND SYNTHESIS COMPONENTS EXTRACELLULAR MATRIX IN CULTURE FIBROBLASTS

© 2019 U. G. Suhovej¹, E. G. Kostolomova^{1,2*}, I. G. Unger¹, T. V. Akuneeva¹, I. A. Aptekar³

*E-mail: lenakost@mail.ru

¹«Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;
²FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia;

³ANO «Tyumen institute of manual medicine», Tyumen, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 29.03.2019

It is established, that cultivation fibroblasts in conditions hypoxia leads to decrease in their morphological heterogeneity, increase proliferative to activity and viability of cells. Causes oppression of synthesis of components extracellular matrix (collagen and elastin) and decrease expression a receptor hyaluronic acids (CD44). Duration hypoxia causes a degree of decrease.

Key words: hypoxia, fibroblasts, flow cytometry, collagen, elastin

Authors:

Suhovej J. G., MD (Medicine), Professor, Director «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;
Kostolomova E. G., PhD (Biology), the assistant to faculty of pathological physiology FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia. **E-mail:** lenakost@mail.ru;
Unger I. G., PhD (Medicine), leading research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;
Akuneeva T. V., senior research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;
Aptekar' I. A., PhD (Medicine), Director ANO «Tyumen institute of manual medicine», Tyumen, Russia.