

В.Я. Березовський, Л.М. Плотнікова, С.П. Весельський, І.Г. Літовка

Життєдіяльність мезенхімальних стромальних клітин за умов зниженого парціального тиску кисню

Досліджено вплив зниженого парціального тиску кисню (P_{O_2}) на амінокислотний склад культуральної рідини мезенхімальних стромальних клітин (МСК) лінії 4BL людини. Зареєстровано вірогідне зниження концентрації проліну й оксипроліну при 23 мм рт. ст. (3 % кисню) на 31 %, а серину і аспарагінової кислоти на 45 % відносно контролю. Максимальне споживання необхідних для синтезу колагену вільних амінокислот із культуральної рідини (проліну і оксипроліну на 42 %, серину і аспарагінової кислоти на 62 %) спостерігали при P_{O_2} у газовій фазі середовища 38 мм рт. ст. (5 % O_2). При P_{O_2} 76 мм рт. ст. (10 % O_2) нестача амінокислот проліну і оксипроліну становила лише 21 %, а глутаміну і аланіну – 12 % відносно контролю. Таке співвідношення інтенсивності споживання амінокислот може свідчити про те, що максимальна життєдіяльність МСК відбувається при P_{O_2} 38 мм рт. ст.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, амінокислотний склад, парціальний тиск кисню.

ВСТУП

Мезенхімальні стромальні (стовбурові) клітини (МСК) широко використовуються у регенеративній медицині та трансплантології. Основними їх джерелами вважають кістковий мозок, жирову тканину, плаценту, пуповину, тощо [1–3]. Ці клітини синтезують такі компоненти позаклітинного матриксу: фібронектин, колаген, гіалуронову кислоту, протеоглікани тощо [4].

У вигляді нерозчинних позаклітинних волокон колаген входить до складу кісток, сухожилля, судин, хрящів і шкіри. Цей фібрилярний білок забезпечує міцність та еластичність сполучної тканини організму. Амінокислотний склад колагену відрізняється від інших білків. Поліпептидний ланцюг молекули колагену складається з 19 амінокислот, основними з яких є гліцин (27,2 %), пролін (15,1 %), глутамінова кислота (11,3 %), аланін (9,5 %). У первинній структурі білка немає триптофану, цистину, а також низький вміст тирозину та метіоніну. Колаген характеризується наявністю оксипроліну й оксилізіну (до

23 %), які не зустрічаються в інших білках. Ці амінокислоти відіграють надзвичайно важливу роль у стабілізації триспиральної конформації молекул білка [5–7].

Парціальний тиск кисню (P_{O_2}) є одним із факторів, що забезпечує функціональний стан як організму в цілому, так і будь-яких його систем, тканин і клітин. У дослідженнях *in vivo* та *in vitro* відтворені численні спроби встановити ефекти змін P_{O_2} на фізіологічні процеси МСК. Однак отримані дані про вплив штучної газової суміші на синтез колагену неоднозначні. Це пов'язано насамперед з умовами проведення дослідження: рівнем P_{O_2} , загальною тривалістю дії газових сумішей, співвідношенням періодів гіпо- та реоксигенації [8–10].

Метою нашої роботи було дослідження впливу зниженого P_{O_2} на амінокислотний склад культуральної рідини МСК лінії 4BL людини.

МЕТОДИКА

Клітинна лінія 4BL – це мультипотентні МСК, одержані з периферичної крові здоро-

вого донора і переведені в умови стандартної моношарової культури. Клітинна лінія отримана у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [11].

Для вирощування клітин лінії 4BL використовували середовище Ігла у модифікації Дюльбекко (DMEM, від англ. Dulbecco's modified Eagles medium; "Sigma", США) із додаванням 10%-ї ембріональної сироватки теляти ("Sigma", США), 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Клітини культивували при 37°C у скляних чашках Петрі (d=35 мм). Контрольну групу клітин тримали в стандартних умовах CO₂-інкубатора: 5 % CO₂ і 95 % повітря (20 % O₂, що відповідає 159 мм рт. ст.). У дослідних варіантах використано три газові суміші зі зниженим парціальним тиском кисню такого складу:

- 1) 3 % O₂ (23 мм рт. ст.) + 5 % CO₂ + 92 % N₂;
- 2) 5 % O₂ (38 мм рт. ст.) + 5 % CO₂ + 90 % N₂;
- 3) 10 % O₂ (76 мм рт. ст.) + 5 % CO₂ + 85 % N₂.

Клітини інкубували протягом 24 год у газових сумішах, потім переносили у CO₂-інкубатор без зміни живильного середовища. Проби культуральної рідини відбирали на 3-тю (72 год) й 4-ту (96 год) добу культивування клітин.

Концентрацію вільних амінокислот (гліцин і метіонін, пролін і оксипролін, серин і аспарагінова кислота, аланін і глутамін) у культуральній рідині визначали методом тонкошарової хроматографії. Для цього до

1 мл безклітинного живильного середовища додавали 2 мл суміші спирту та ацетону (1:3), перемішували і через 30 хв центрифугували (10 хв при 3 000 хв⁻¹). Супернатант випарювали до 1 мл і наносили на хроматографічний папір по 20 мкл. Використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий спирт, бутиловий спирт, оцтову кислоту, мурашину кислоту та воду (9:7:4:2:5 за об'ємом) [12, 13].

Результати обробляли з використанням програми Microsoft Excell 2003 та програми OriginPro 7,5. Для оцінки вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених досліджень показали, що концентрація вільних амінокислот гліцину (дефіцит призводить до порушення структури сполучної тканини) і метіоніну у культуральній рідині (при 10 % O₂) на 3-тю добу культивування вища на 85 % (P<0,05) порівняно з контролем (рис. 1,а). На 4-ту добу цей показник зріс лише на 9 % (див. рис. 1,б). Концентрація амінокислот у 1-й і 2-й дослідних групах (3 % та 5 % O₂) за той самий період була вірогідно більшою на 60 і 47 % відповідно (див. рис. 1,б), порівнюючи з контрольним зразком.

У процесі культивування МСК в умовах зниженого Po₂ на 3-тю добу концентрація

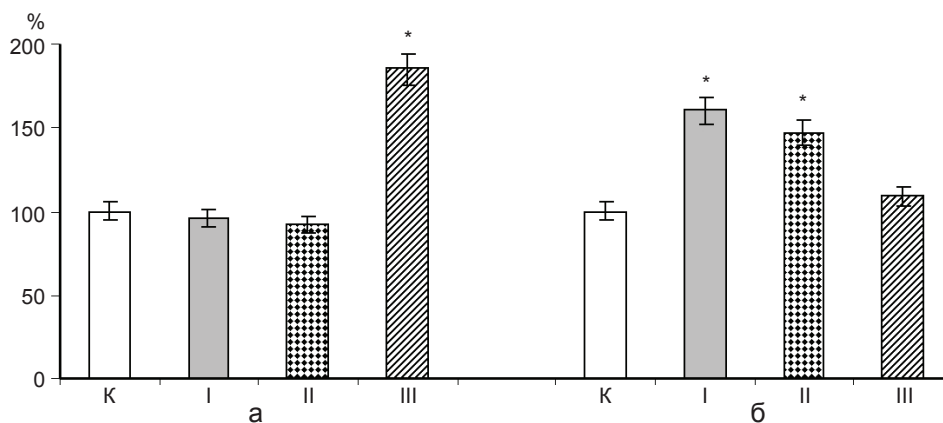


Рис. 1. Концентрація гліцину і метіоніну у культуральній рідині контрольних (К – 20 % O₂) і дослідних (I – 3 % O₂, II – 5 % O₂, III – 10 % O₂) груп на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

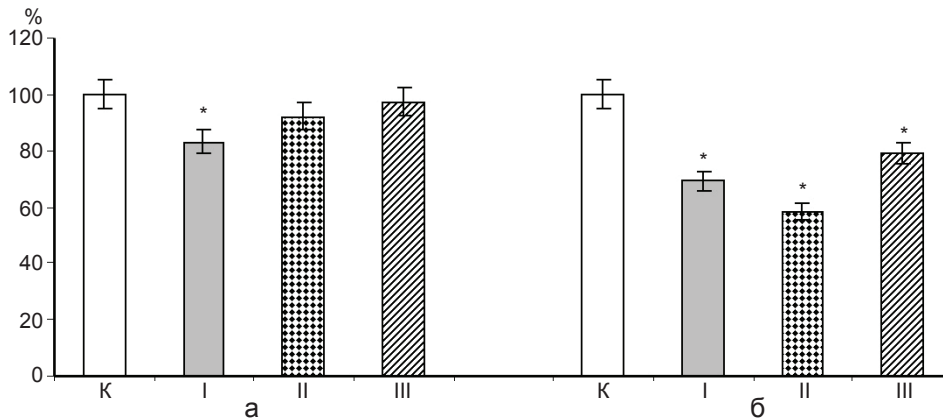


Рис. 2. Концентрація проліну і оксипроліну у культуральній рідині контрольних (К– 20 % O₂) і дослідних (I – 3 % O₂, II – 5 % O₂, III – 10 % O₂) груп на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

проліну (основний елемент колагену) і оксипроліну майже не змінювалася відносно контролю (рис. 2,а). На 4-ту добу їх вміст знизився в усіх дослідних групах: у 1-й на 31 %, у 2-й – 42 %, у 3-й – 21 % (див. рис. 2,б).

Вміст вільних амінокислот серину і аспарагінової кислоти у культуральній рідині МСК знижувався залежно від часу культивування у газовому середовищі з Po₂ 23 і 38 мм рт. ст. (рис. 3,а,б). На 4-ту добу – у 1-й і 2-й групах їх концентрація вірогідно зменшилася на 45 і 62 % (P<0,05) відповідно щодо контролю (див. рис. 3,б).

Концентрація вільного аланіну (бере участь у синтезі колагену) і глутаміну на 3-тю добу культивування клітин у всіх досліджуваних групах не відрізнялася від

значень контролю (рис. 4,а). Тоді як на 4-ту добу їх вміст був вищим у 1-й і 2-й групах на 19 та 23 % відповідно (див. рис. 4,б), і зменшувався у 3-й – на 12 % порівняно з контролем.

Наведені результати дають змогу зробити висновок, що концентрація найбільш значущих для сполучної тканини вільних амінокислот, які безпосередньо беруть участь у синтезі колагену змінювалася по-різному. Аналіз змін вільних амінокислот культуральної рідини МСК лінії 4BL людини показав їх значну чутливість до змін Po₂. Так, ми спостерігали вірогідне зниження концентрацій проліну і оксипроліну; серину та аспарагінової кислоти на 4-ту добу культивування при Po₂ 23 мм рт. ст., проте максимальний ефект отримано

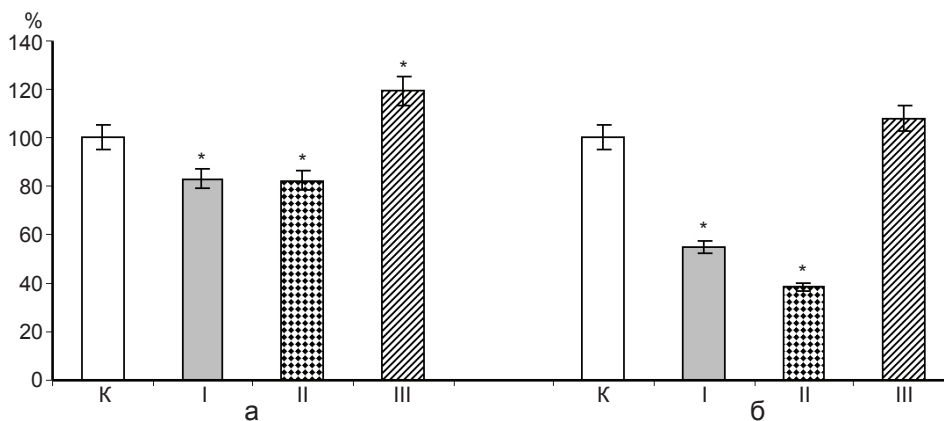


Рис. 3. Концентрація серину і аспарагінової кислоти у культуральній рідині контрольних (К– 20% O₂) і дослідних (I – 3 % O₂, II – 5 % O₂, III – 10 % O₂) груп на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

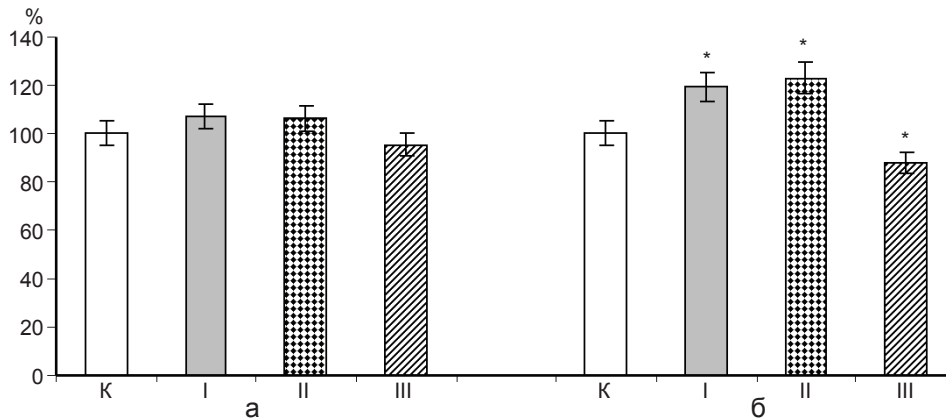


Рис. 4. Концентрація аланіну і глутаміну у культуральній рідині контрольних (К– 20% O₂) і дослідних (I – 3 % O₂, II – 5 % O₂, III – 10 % O₂) груп на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. *P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

при P_{O₂} 38 мм рт. ст. Оскільки мінімальна концентрація речовини виникає в місці її інтенсивного споживання, ми вважаємо, що цей факт свідчить про максимальну інтенсивність життєдіяльності клітин за таких умов. Тому знижений вміст цих амінокислот вказує на інтенсифікацію синтезу колагену. Отримані результати узгоджуються з літературними даними інших дослідників, які показали, що введення в зону перелому трубчастой кістки щурів мультипотентних МСК кісткового мозку, культивованих при 5% кисню сприяло збільшенню коефіцієнта потовщення кісткової мозолі і хрящової тканини [10, 14].

У клітинах постійно підтримується певний стаціонарний вміст амінокислот – фонд (пул) вільних амінокислот. Він оновлюється внаслідок надходження амінокислот і використовується для синтезу біологічно важливих хімічних компонентів клітини. Тобто можна виділити шляхи надходження та використання клітинного пулу амінокислот.

Шляхи надходження вільних амінокислот, що утворюють амінокислотний фонд у клітині при культивуванні *in vitro*: 1. Транспорт амінокислот із живильного середовища, у нашому випадку це DMEM. Враховуючи, що культивування МСК відбувалося без зміни цього середовища протягом 4 днів запаси поживних речовин поступово виснажувались і накопичувались метаболіти. 2. У клітині

з проміжних продуктів окиснення глюкози і циклу лимонної кислоти можуть синтезуватися замінні амінокислоти. До них відносять: гліцин, серин, аланін, аспарагінову кислоту, аспарагін, глутамінову кислоту, глутамін, пролін. Серин синтезується з проміжного продукту гліколізу 3-фосфогліцерату, а аміногрупу отримує від глутамінової кислоти. Гліцин – також замінна амінокислота, основним джерелом якої є серин. 3. Внутрішньоклітинний гідроліз білків (каталізують лізосомальні протеази) [3].

Шляхи використання амінокислотного фонду: 1. Синтез білків і пептидів – це основний шлях споживання амінокислот (75–80% амінокислот клітини йде на їх синтез). 2. Синтез небілкових азотвмісних сполук (пуринових і піримідинових нуклеотидів, холіну, креатину, деяких вітамінів тощо). 3. Синтез глюкози з використанням вуглецевих скелетів глікогенних амінокислот (глюконеогенез). 4. Синтез ліпідів з використанням ацетильних залишків вуглецевих скелетів кетогенних амінокислот. 5. Окиснення до кінцевих продуктів обміну (CO₂, H₂O, NH₃) – це один із шляхів забезпечення клітини енергією (до 10% загальних енергетичних потреб). Усі амінокислоти, які не використовуються в синтезі білків та інших фізіологічно важливих сполук, піддаються розщепленню [3, 12].

За рахунок цих процесів можна пояснити зміни концентрації амінокислот у живиль-

ному середовищі з часом культивування. Як свідчать отримані нами результати, вміст вільного гліцину і метіоніну, серину і аспарагінової кислоти у супернатанті на 4-ту добу культивування знижувався на 76 та 11 % відповідно порівняно з 3-ю добою при P_{O_2} 76 мм рт. ст. (див. рис. 1, 3).

Слід підкреслити, що білковий обмін тісно інтегрований з обміном вуглеводів, ліпідів і нуклеїнових кислот через амінокислоти або α -кетокислоти (α -кетоглутарат, оксалоацетат і піруват). Так, аспарагінова кислота або аланін за допомогою трансамінування знову перетворюються відповідно в оксалоацетат і піруват, які безпосередньо включаються до вуглеводного обміну.

Особливо дефіцитними для життєдіяльності клітин є лізин, метіонін і триптофан (незамінні амінокислоти). Зокрема, метіонін бере участь в обміні жирів, фосфатидів, ціанокобаламіну (вітаміну B12) та фолієвої кислоти [15].

Клітини потребують постійного надходження молекулярного кисню для метаболічних процесів, що включають оксидативне фосфорилування, в якому O_2 є кінцевим акцептором вільних електронів у процесі утворення АТФ. У дослідженнях *in vitro* на МСК із жирової тканини людини Рилова і співавт. [16] показали, що зменшення концентрації кисню (5 % O_2) знижує споживання клітинами глюкози, збільшує молярне співвідношення лактату/глюкози та зменшує трансмембранний потенціал мітохондрій. Це супроводжується підвищенням експресії генів, що кодують усі ферменти гліколітичного шляху катаболізму глюкози. Водночас активується клоногенний потенціал і проліферація МСК.

Дані літератури дають підстави припустити, що основний механізм стимулювальної дії зниженого P_{O_2} реалізується через активацію кисеньчутливих сигнальних сполук. Відомо, що більшість клітин ссавців відповідають на зниження P_{O_2} активацією експресії генів і синтезом білків *de novo*. Встановлені ре-

докс-сенситивні фактори, найвідомішим з яких є білок-активатор-1 (AP-1) та індукований гіпоксією фактор (HIF-1) [17, 18].

ВИСНОВКИ

1. Культивування МСК лінії 4BL людини при зниженому P_{O_2} (23 і 38 мм рт. ст.) протягом 24 год вірогідно зменшує концентрацію деяких вільних амінокислот у культуральній рідині, що беруть участь у синтезі колагену.

2. При інкубації клітин лінії 4BL у газовому середовищі з 76 мм рт. ст. кисню на 4-ту добу зареєстровано в культуральній рідині статистично вірогідне зниження концентрації проліну й оксипроліну (на 21 %), а також аланіну й глутаміну (на 12 %).

3. Максимальна інтенсивність споживання амінокислот, потрібних для синтезу колагену, була при концентрації кисню у газовій фазі культурального середовища 5 % (38 мм рт. ст.).

**В.А. Березовский, Л.Н. Плотникова,
С.П. Весельский, И.Г. Литовка**

ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ СНИЖЕННОГО ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

Исследовано влияние пониженного парциального давления кислорода (P_{O_2}) на аминокислотный состав культуральной жидкости мезенхимальных стромальных клеток (МСК) линии 4BL человека. Зарегистрировано достоверное снижение концентрации пролина и оксипролина при 23 мм рт. ст. (3 % кислорода) на 31 %, серина и аспарагиновой кислоты на 45 % относительно контроля. Максимальное потребление необходимых для синтеза коллагена свободных аминокислот из культуральной жидкости (пролина и оксипролина на 42 %, серина и аспарагиновой кислоты на 62 %) наблюдали при P_{O_2} в газовой фазе среды 38 мм рт. ст. (5 % O_2). При P_{O_2} 76 мм рт. ст. (10 % O_2) недостача аминокислот пролина и оксипролина составляла лишь 21 %, а глутамина и аланина – 12 % относительно контроля. Такое соотношение интенсивности потребления аминокислот может свидетельствовать о том, что максимальная жизнедеятельность МСК происходит при P_{O_2} 38 мм рт. ст.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, аминокислотный состав, парциальное давление кислорода.

**V.A. Berezovskii, L.N. Plotnikova, S.P. Veselskii,
I.G. Litovka**

THE INFLUENCE OF LOW PARTIAL OXYGEN PRESSURE ON THE BIOLOGICAL PROCESS OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS

The influence of low partial oxygen pressure (P_{O_2}) on the amino acid composition in culture medium of human mesenchymal stromal cell (MSC) lines 4BL has been studied. At 23 mm Hg (3% oxygen), a significant decrease (by 31%) in the concentration of proline and hydroxyproline was registered. Under these conditions, the concentration of serine and aspartic acid decreased by 45% compared to the control. Maximum consumption of free amino acids from the culture medium required for the synthesis of collagen (proline and hydroxyproline by 42%, serine and aspartic acid by 62%) was observed at a gas-phase P_{O_2} of 38 mm Hg (5% O_2). At P_{O_2} 76 mm Hg (10% O_2), a lack of amino acids proline and hydroxyproline was only 21%, while that of glutamine and alanine amounted 12% compared to the control. This intensity ratio of consumption of amino acids may indicate that the maximum of MSC vital functions occurs at P_{O_2} 38 mm Hg. Key words: mesenchymal stromal cells, amino acid composition, partial oxygen pressure.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cell from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cell.* 2010; 2 (4): 81–92.
2. Bozo I, Deev R, Pinaev G. Is “fibroblast” a specialized cell or a functional condition of mesenchymal cells derivatives? *Cytology.* 2010; 52 (2): 99–109.
3. Taghizadeh R, Cetrulo K. Wharton’s Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta.* 2011; 32 (4): 311–315.
4. Bogdan V, Zafranskaya M, Guyn Y. Collagen synthesis mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro and in autologous. *Proceedings of the International Conference «Fundamental science – medicine».* Minsk, 2013: 90–94.
5. Astakhova V. Osteogenic cell precursors from human bone marrow. Kiev: Phoenix. 2000: 176 p.
6. Berezov T, Korovkin B. *Biological Chemistry.* Moscow: Medicine. 1990: 528 p.
7. Severin E. *Biochemistry.* Textbook for Universities: GEOTAR-MED. 2003: 779 p.
8. Astakhova V, Berezovskii V, Panchenko L, Khasabova I. The stromal cells of human bone-marrow cloning by of low partial oxygen pressure. *Fiziol Zh.* 2001; 47 (1): 40–44.
9. Berezovskii V, Yanko R, Chaka O, Litovka I, Zamorska T. The hypoxic gas mixture of level sanogene effects on lungs reactivity the rats of different age. *Bulletin of Lviv University. Biology Series.* 2012; 59: 227–234.
10. Valyushkina M, Buravkova L. Effect of O_2 in the medium on multipotent mesenchymal progenitor cells from bone marrow of different ages rats. *Med Acad J.* 2012; 12 (3): 57–59.
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: 493–498.
12. Kaznacheeva A, Zlydnev N. The content of free amino acids in healthy blood plasma, erythrocytes and urine. *Lab Work.* 1976; 8: 479–480.
13. Korobeinikova E, Meshcheriakova G. Determination of free amino acids in the serum and urine of healthy children. *Lab Work.* 1981; 4: 221–224.
14. 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.
15. Karaev A. Amino acids – the basis of life. *Disease prevention and health promotion.* 2008; 3: 51–54.
16. Rylova Y, Andreeva E, Buravkova L. Proliferation and metabolic status of mesenchymal stromal cells from adipose tissue in a different oxygen content in the culture medium. *Aerospace and Environ Med.* 2010; 44 (5): 38–41.
17. Semenza G. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Cell.* 2000; 88 (4): 1474–80.
18. Prabhakar N. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 2001; 90 (5): 1986–94.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Наук.-досл. ін-т фізіології ім. акад. Петра Богача, Київ
E-mail: plotnikov92@mail.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 25.12.2013*