

УДК 576.5.085.23:57.044

А. Г. ПОЛЕШКО, Е. С. ЛОБАНОК, И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА РОСТА bFGF НА ПРОЦЕСС ГЕМООБРАЗОВАНИЯ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: renovacio888@yandex.ru

(Поступила в редакцию 31.10.2013)

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) функционируют в организме в условиях особого микроокружения, так называемой «нише» стволовых клеток (СК), характеризующейся определенным уровнем межклеточных контактов, газовым и молекулярным составом среды и другими параметрами [1]. Иными словами, под «нишей» следует понимать оптимальную для сохранения жизнеспособности, свойств плюрипотентности и самоподдержания СК микросреду. Микроокружение включает ростовые факторы, которые выполняют ряд стимулирующих и сохраняющих функций по отношению к локализирующимся там клеткам. В значительных концентрациях в «нише» отмечено присутствие цитокинов и хемокинов, компонентов внеклеточного матрикса и др. [2]. Среди них особое значение имеет фактор роста фибробластов (bFGF), который оказывает стимулирующее действие на пролиферативную активность, функциональное состояние многих типов клеток, в том числе стволовых [3]. Кроме того, bFGF способствует подавлению активности проапоптотического белка p53, что повышает жизнеспособность клеток в культуре [4].

Установлено, что МСК в процессе своей жизнедеятельности сами активно продуцируют bFGF, но уровень его экспрессии, вероятно, недостаточен для поддержания клеток в недифференцированном состоянии [5]. Отмечено, что внесение bFGF в среду культивирования МСК может оказывать двоякое действие: с одной стороны, поддерживать пролиферативную активность клеток с сохранением широкого дифференцировочного потенциала, с другой – при совместном действии с другими ростовыми факторами, коммитировать клетки к дифференцировке в эндотелиальном, хондроэном, нейрональном и других направлениях [6, 7].

Имитация состава ниши СК *in vitro*, характерного для физиологических условий, может способствовать их развитию в режиме, адекватном для их жизнедеятельности *in vivo*. При этом, модулируя различные условия культивирования, изменяя параметры культуральной среды, можно добиться модификации свойств МСК в желаемом направлении, подавляя или стимулируя в клетке различные ветви метаболизма.

Гемообразование – важный процесс жизнедеятельности клетки [8], который отражает ее функциональный статус и может служить одним из индикаторов физиологического состояния МСК в условиях культивирования. Поскольку в норме в реальных условиях концентрации промежуточных продуктов гемообразования крайне низкие, осуществлять его мониторинг и исследовать чувствительность к внешним условиям представляется трудновыполнимой задачей. При изучении этого процесса в клетках в качестве стимулятора порфириногенеза часто используют экзогенную аминолевулиновую кислоту (АЛК), которая является ранним предшественником порфириновых пигментов и гема [8]. С учетом этого влияние bFGF на гемообразование изучалось в условиях его индукции экзогенной АЛК.

Цель работы – исследование влияния bFGF на АЛК-индуцированное накопление эндогенных порфиринов и гема в МСК костного мозга (КМ) крыс.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на МСК КМ белых беспородных крыс 3–5-месячного возраста.

Клеточная культура. МСК выделяли из бедренных и большеберцовых костей крысы, вымывая костномозговую стержень средой α -MEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone), 2 mM L-глутамин (Sigma), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Полученный материал гомогенизировали до клеточной суспензии, которую ресуспендировали в вышеуказанной среде и высевали в культуральные флаконы (Sarstedt) из расчета $1-2 \cdot 10^6$ клеток на 1 см^2 поверхности пластика в условиях нормоксии. Через 24 ч среду с неадгезированными клетками удаляли, адгезированные клетки промывали 0,155 М фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ), pH=7,4 и заливали свежей питательной средой. Смену среды проводили каждые 3 сут. При достижении 70–80 % конfluenceности монослоя клетки обрабатывали 0,25–0,02%-ным раствором трипсин-ЭДТА (Stem Cell Technology) и пересевали в новые флаконы. В экспериментах использовали клетки 2–3-го пассажа. Фенотипический анализ показал, что в исследуемых культурах до 94–96 % клеток характеризовались фенотипом CD29⁺/CD44⁺/CD90⁺, типичным для МСК КМ. Содержание клеток с фенотипом CD34⁺/CD45⁺, характерным для гемопоэтических клеток, не превышало 2 %. Для изучения влияния bFGF на время удвоения популяции МСК КМ спустя 1 сут после посева клетки переводили из среды с 10 % ЭТС в среду культивирования такого же состава, но содержащую 2 % ЭТС. Затем к МСК КМ добавляли bFGF (Sigma) в концентрациях 1, 5, 7, 10, 14 нг/мл и продолжали культивировать в стандартных условиях (5 % CO₂, 95 % атмосферного воздуха) в течение 72 ч, после чего клетки снимали с пластика, подсчитывали в камере Горяева и вычисляли по формуле $y = t / (3,32 \cdot \lg(N/N_0))$ [9], где y – время удвоения популяции МСК КМ, t – период времени роста культуры, N – начальное количество клеток, N_0 – конечное количество клеток.

Определение концентрации АЛК [10]. Для определения внутриклеточного содержания АЛК к 1 мл клеточной суспензии (10^7 кл/мл) добавляли 0,5 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты. Затем образцы выдерживали в кипящей водяной бане в течение 15 мин, охлаждали до комнатной температуры, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, отбирали супернатант в отдельную пробирку, к осадку добавляли 1 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH=4,6), ресуспендировали и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Полученные супернатанты объединяли и к ним добавляли 1 каплю 100%-ного ацетилацетона. Далее пробы помещали в кипящую водяную баню на 15 мин, после охлаждения к ним добавляли реактив Эрлиха в соотношении 1 : 1 и через 10 мин измеряли оптическую плотность на фотометре Spekol 11 при $\lambda = 555$ нм. Концентрацию АЛК определяли по калибровочной прямой.

Определение содержания порфириновых пигментов [11]. После снятия МСК КМ с пластика клетки (10^5 кл/мл) переводили в ФСБ, куда вносили АЛК в конечной концентрации 0,8 mM [12, 13]. Пробы инкубировали в течение 4 ч при 37 °C, затем на спектрофлуориметре Solar CM2203 определяли содержание АЛК-индуцированных порфириновых пигментов по интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 636$ нм) клеточной суспензии. Содержание порфиринов выражали в относительных единицах на 10^6 клеток.

Определение содержания гема [14]. Концентрацию гема в МСК КМ измеряли по количеству протопорфирина-IX (ПП), образующегося в клетках в результате выхода железа из гема, после их кипячения в 2 М щавелевой кислоте в течение 40 мин. Для построения калибровочной зависимости использовали растворы гемина, содержащие 1%-ный бычий сывороточный альбумин. Измерение флуоресценции ПП проводили на спектрофлуориметре Solar CM2203 ($\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 605$ нм).

Определение экспрессии белка CD71. Для определения уровня экспрессии белка CD71 – рецептора трансферрина [15] – МСК КМ в количестве 10^5 клеток ресуспендировали в 200 мкл ФСБ с 1 % ЭТС. Затем в суспензию вносили меченые флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) антитела к белку CD71 (Termo scientific), выдерживали 30 мин в темноте при комнатной температуре, отмывали 2 раза коммерческим раствором ЭТС и осадок ресуспендировали в 200 мкл ФСБ. Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson) в канале FITC, гистограммы их распределения по интенсивности флуоресценции FITC-CD71 анализировали с помощью программного обеспечения DIVA-6.0. Об уровне экспрессии транспортного белка судили по доле связанных с ним CD71-антител, меченных FITC (в %). В качестве контроля использовали пробы с добавлением немеченых FITC моноклональных антител того же изотипа, что и антитела против исследуемого маркера.

Обработка МСК фумитреморгином-С (ФТС). ФТС является функциональным блокатором белка-транспортера порфириновых пигментов ABCG2 (ATP-binding cassette (ABC), subfamily G, mem-

ber 2) [16]. Для определения эффективности трансмембранного транспорта пигментов ФТС (Sigma-Aldrich) в концентрации 10 мкМ [16] добавляли к суспензии МСК КМ в ФСБ и выдерживали в темноте 1,5 ч при 37 °С, затем пробы центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин, отделяли супернатант от осадка клеток и оценивали в них, как описано выше, содержание порфириновых пигментов.

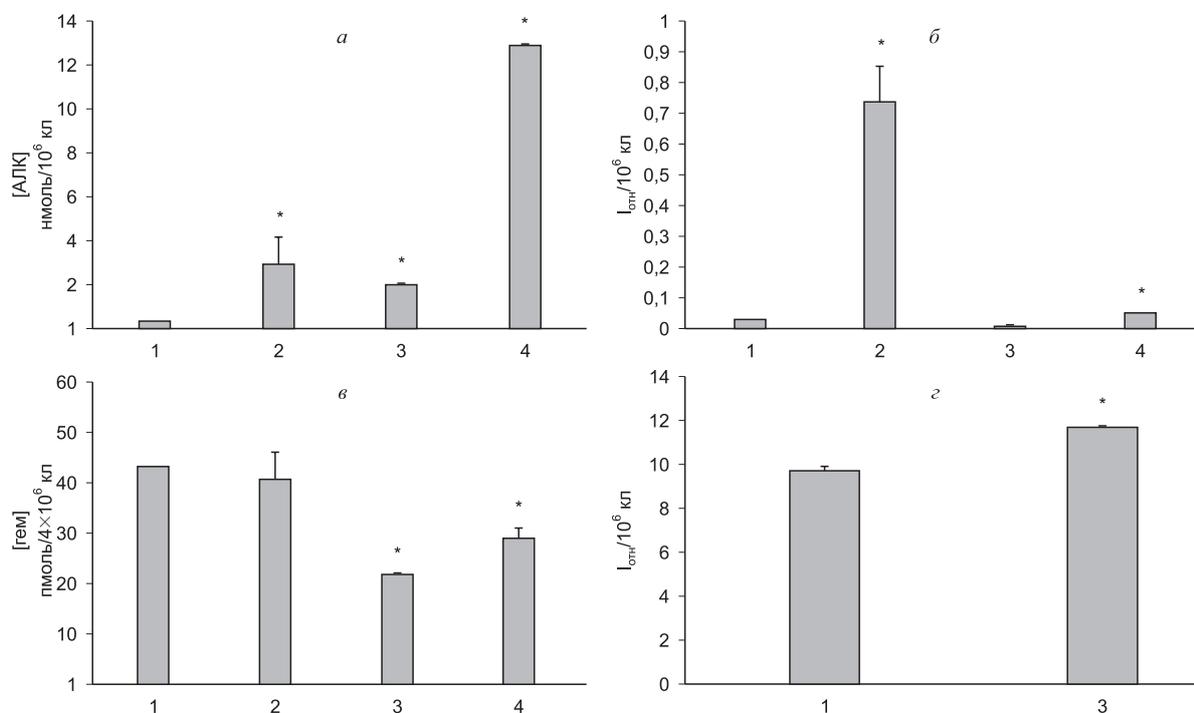
Статистический анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Данные представляли в виде средних величин ± стандартное отклонение. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При культивировании МСК КМ с различными концентрациями bFGF было установлено, что наибольшую эффективность в качестве стимулятора пролиферативной активности клеток как неотъемлемого показателя нахождения культуры на пике функциональной активности фактор bFGF проявляет при 7 нг/мл. В данных условиях наблюдалось минимальное время удвоения культуры МСК КМ 2–3-го пассажа, что соответствует максимальной пролиферативной активности клеток (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Влияние разных концентраций bFGF (время инкубации МСК КМ с фактором составляло 72 ч) на пролиферативную активность МСК КМ

Параметр	Концентрация bFGF, нг/мл					
	Контроль	1	5	7	10	14
Время удвоения популяции клеток, ч	64±0,29	62±0,34	63±0,52	57,1±0,14	59,4±0,09	62±0,05

С учетом этого при исследовании влияния bFGF на процесс гемообразования в МСК КМ мы использовали его концентрацию в 7 нг/мл. Оказалось, что bFGF повышает внутриклеточное содержание АЛК ($p < 0,05$), что может свидетельствовать об увеличении ее синтеза в МСК КМ под действием фактора роста, тогда как на фоне индукции процесса порфириногенеза экзогенной АЛК (0,8 мМ; 4 ч) [12, 13] внесение bFGF (7 нг/мл; 72 ч) в среду роста способствовало внутриклеточному накоплению АЛК, которое превышало в 4,4 раза накопление АЛК в контрольных клетках ($p < 0,05$) (рисунок а).



Влияние bFGF (7 мкл/мл; 72 ч) на отдельные характеристики процесса гемообразования в МСК КМ: внутриклеточное содержание АЛК (а), порфиринов (б), гема (в), экспрессию CD71 – рецептора трансферрина (г): 1 – контроль; 2 – АЛК (0,8 мМ, 4 ч); 3 – bFGF (7 мкл/мл; 72 ч); 4 – bFGF (7 мкл/мл; 72 ч) + АЛК (0,8 мМ, 4 ч). Звездочка (*) – $p < 0,05$

Данный факт может свидетельствовать о том, что под действием bFGF клеточная мембрана МСК КМ становится более проницаемой для АЛК наряду с повышением ее синтеза в клетках. Также следует отметить, что содержание порфириновых пигментов в МСК КМ при внесении ростового фактора в среду культивирования клеток практически не менялось, оставаясь следовым (рисунок б). Для индукции порфириногенеза использовали экзогенную АЛК (0,8 мМ), с которой клеточную суспензию инкубировали в течение 4 ч. В этом случае культивирование МСК КМ с фактором bFGF (7 нг/мл; 72 ч) вызвало снижение внутриклеточного содержания порфириновых пигментов в МСК КМ по сравнению с клетками, обработанными АЛК, в 14,8 раза ($p < 0,05$) (рисунок б). По этому факту можно судить о том, что bFGF либо изменяет последующие за внесением АЛК стадии гемообразования и, как следствие, включение порфиринов в эту метаболическую цепь, либо каким-то образом способствует выходу порфириновых пигментов из клетки.

Следующим этапом работы стало исследование действия ростового фактора на синтез конечного продукта данной метаболической цепи – гема. Эксперименты показали, что инкубирование МСК КМ с экзогенной АЛК (0,8 мМ; 4 ч) не вызывает увеличения концентрации внутриклеточного гема, в то время как внесение в среду фактора роста bFGF ведет к падению его содержания в клетках, как инкубированных с экзогенной АЛК, так и без нее в 1,4 и 1,96 раз соответственно ($p < 0,05$) (рисунок в). Первый факт можно объяснить тем, что концентрация гема является консервативным для клетки параметром, так как избыток гема, не задействованный в образовании гемопротейдов (свободный гем), является потенциально токсичным, поэтому по механизму обратной связи посредством подавления экспрессии фермента АЛК-синтазы замедляется или останавливается процесс синтеза гема [8]. Снижение концентрации внутриклеточного гема, по видимому, является результатом уменьшения содержания порфириновых пигментов, в частности ПП, являющегося непосредственным субстратом синтеза гема.

Для получения дополнительной информации о влиянии фактора роста фибробластов на процесс гемообразования на фоне внесения bFGF в среду роста клеток была изучена экспрессия CD 71 – белка-рецептора трансферрина 1-го типа, являющегося переносчиком Fe^{2+} . Оказалось, что bFGF вызывает повышение экспрессии данного белка в клетке в 1,2 раза ($p < 0,05$) (рисунок з). Иными словами, ростовой фактор контролирует процесс гемообразования, также активируя транспорт ионов железа в клетку, где они инкорпорируются в молекулы ПП. Кроме того, в исследованиях биогенеза эритроцитов и пролиферации клеток лейкемии и лимфомы у человека показано, что экспрессию белка CD71 рассматривали в качестве маркера высокой пролиферативной активности и плюрипотентного состояния клеток [17, 18]. Это подтверждает тот факт, что внесение bFGF в среду роста клеток способствует поддержанию у МСК КМ основного их свойства – высокой пролиферативной активности.

Известно, что за выход порфиринов из клетки в окружающую среду отвечает трансмембранный белок-переносчик ABCG2 [16], при этом его экспрессия в клетке коррелирует с внутриклеточным содержанием порфиринов [16]. Для установления возможной связи между влиянием bFGF на внутриклеточное содержание порфириновых пигментов и работой транспортера ABCG2 была предпринята попытка заблокировать на фоне АЛК-индукции функциональную активность данного белка его специфическим блокатором – ФТС. Как и следовало ожидать, блокада активности ABCG2 приводила к росту содержания порфиринов в клетках и его падению в супернатанте. bFGF, однако, существенно не менял ситуацию: в присутствии ФТС содержание порфиринов в клетках и супернатанте росло и падало соответственно (табл. 2), что говорит об отсутствии существенной связи между влиянием bFGF на внутриклеточное содержание порфиринов и работой транспортера ABCG2.

Заключение. Фактор роста фибробластов bFGF повышает синтез эндогенной аминокислоты (АЛК) в мезенхимальных стволовых клетках (МСК) костного мозга (КМ) и их емкость по отношению к экзогенной АЛК. Несмотря на это, внесение bFGF в среду роста МСК КМ способствует снижению внутриклеточного содержания порфириновых пигментов при АЛК-индукции, возможно, опосредованно через выведение избытка порфиринов из клетки белком-

Т а б л и ц а 2. Влияние ФТС на содержание порфиринов в МСК КМ и внеклеточной среде в условиях АЛК-индукции при культивировании клеток в присутствии bFGF

Вид образца и условия культивирования	Относительное содержание порфиринов ($I_{\text{ФТС}}$, отн.ед./10 ⁶ кл)	
	контроль	bFGF (7 нг/мл; 72 ч)
Клетки, АЛК (0,8 мМ; 4 ч)	0,69±0,05	0,05±0,00*
Клетки, АЛК (0,8 мМ; 4 ч) ФТС (10 мкМ; 1,5 ч)	0,85±0,02 ⁺	0,07±0,00* ⁺
Супернатант, АЛК (0,8 мМ; 4 ч)	0,09±0,02	0,018±0,00*
Супернатант, АЛК (0,8 мМ; 4 ч) ФТС (10 мкМ; 1,5 ч)	0,02±0,00 ⁺	0,013±0,00* ⁺

* $p < 0,05$ по сравнению со значениями при культивировании МСК КМ без bFGF.

⁺ $p < 0,05$ по сравнению со значениями без добавления ФТС.

переносчиком ABCG2. Кроме того, установлено возможное влияние фактора роста на процесс гемообразования, так как bFGF на фоне снижения содержания гема в МСК КМ повышает экспрессию CD71, отвечающего за транспорт Fe²⁺ в клетку, и увеличивает их пролиферативный потенциал.

Таким образом, исходя из того что фактор роста bFGF влияет на пролиферативную активность МСК КМ и способен оказывать воздействие на такие важные процессы жизнедеятельности клетки, как порфирино- и гемогенез, можно сказать, что данный фактор роста может применяться как экзогенный модулятор состояния МСК КМ. Эти результаты могут быть использованы для решения задач по оптимизации условий культивирования МСК в клеточной инженерии.

Литература

1. Жамбалова А. Л., Гершиович Ю. Г., Буравкова Л. Б. и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2009. Т. 4, №3. С. 47–52.
2. Биология стволовых клеток и клеточные технологии / Под ред. М. А. Пальцева. М., 2009. Т. 1. С. 44–59.
3. Gotoh N. // Current Stem Cell Research & Therapy. 2009. Vol. 4, № 1. P. 9–15.
4. Jin X., Beck S., Sohn Y.-W. et al. // Exp Mol Med. 2010. Vol. 42, № 8. P. 574–582.
5. Klagsbrun M. // Prog Growth Factor Res. 1989. Vol. 1. P. 207–235.
6. Fierro F. A., Kalomoiris S., Sondergaard C. S. et al. // Stem Cells. 2011. Vol. 29, № 11. P. 1727–1737.
7. Visser R. Arrabal P. M., Santos-Ruizet L. et al. // Cytokine. 2012. Vol. 58, № 1. P. 27–33.
8. Ferreira G. C. // J. Bioenerg. Biomembr. 1995. Vol. 27, № 2. P. 72–80.
9. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р. Фрешни. М., 1989. С. 62–63.
10. Miller G. W., Denney A., Wood J. K. et al. // Plant cell Physiol. 1979. Vol. 20. P. 131–143.
11. Кузнецова Н. П., Панков В. С., Чибаров А. С. // Порфирии. М., 1981. С. 192.
12. Kennedy J. C., Pottier R. H. // J. Photochem. Photobiol. 1992. Vol. 14. P. 275–292.
13. Биофизика живых систем: от молекулы к организму / Под ред. И. Д. Волотовского. Мн., 2002. С. 161–173.
14. Weinstein J. D., Beale S. I. // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 6799–6807.
15. Aisen P. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004. Vol. 36, № 11. P. 2137–2143.
16. Susanto J., Lin Y. H., Chen Y. N., Shen C. R. et al. // PLoS ONE. 2008. Vol. 3, № 12. e4023.
17. Dong H. Y., Wilkes S., Yang H. // Am J Surg Pathol. 2011. Vol. 35, № 5. P. 723–732.
18. Glasová M., Koníková E., Stasáková J. et al. // Neoplasma. 1998. Vol. 45, № 2. P. 88–95.

A. G. POLESHKO, E. S. LOBANOK, I. D. VOLOTOVSKI

GROWTH FACTOR bFGF INFLUENCE ON THE HEME SYNTHESIS PROCESS IN MSC BM

Summary

The effect of bFGF was investigated on the heme synthesis in rat mesenchymal stem cells (MSCs) under ALA-induction conditions. We found out that more optimal bFGF concentration, influencing on the cell proliferation is 7 ng/ml. Our results demonstrate that bFGF decreases the porphyrins content in MSCs and increases that in cultural medium that can be reflected on the heme amount synthesized in MSCs. Besides, bFGF activates the CD71 expression of the MSCs surface.