

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОБЛАСТОИДНОЙ ЛИНИИ NAMALVA

**О.А. Шашкова, М.П.* Самойлович, А.А. Пиневич, Н.Л. Вартамян,
В.Б. Климович**

ФБГУ РНЦ радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург,

* mpsamoylovich@gmail.com

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) способны угнетать или стимулировать размножение трансформированных клеток в зависимости от гистогенеза последних, уровня их дифференцировки и/или условий культивирования. Задача работы состояла в изучении влияния МСК жировой ткани на пролиферацию лимфобластоидных клеток линии Namalva при разных условиях культивирования. Клетки того и другого типа культивировали в атмосфере с 5% CO₂ и 20% O₂ (нормоксия) или 5% O₂ (гипоксия). Дефицит ростовых факторов создавали за счет использования сыворотки со сниженной ростостимулирующей активностью. Гипоксия стимулировала пролиферацию клеток Namalva при выращивании в среде, богатой ростовыми факторами, и оказывала подавляющий эффект при дефиците ростовых факторов. При сокультивировании клеток Namalva с МСК наблюдали образование тесных контактов между клетками обоих типов. Совместное культивирование клеток Namalva с МСК в стандартной ростовой среде стимулировало пролиферацию лимфобластоидных клеток в нормоксии и при гипоксии. В условиях дефицита сывороточных ростовых факторов сокультивирование с МСК обеспечивало выживание клеток Namalva как в нормоксии, так и при гипоксии, а также способствовало их пролиферации. Таким образом, МСК из жировой ткани обеспечивают выживание и пролиферацию трансформированных В-лимфобластоидных клеток линии Namalva в условиях дефицита ростовых факторов.

Ключевые слова: стволовые клетки, лимфобластоидные линии, сокультивирование.

Накопленные за последнее десятилетие сведения об иммуномодулирующей активности мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток (МСК) (1, 2, 3) дали основания предполагать, что в перспективе МСК могут заменить лекарственную

иммунодепрессию при профилактике проявлений тканевой несовместимости, лечении воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваний. К настоящему времени, однако, активность МСК как биологических иммуномодуляторов изучена лишь в общих чертах. Остается неясным вопрос о влиянии МСК на функции В-лимфоцитов и на процесс превращения их в плазматические клетки-продуценты антител. Опубликованы данные об ингибирующем действии МСК на пролиферацию В-лимфоцитов и на синтез антител (4, 5). В других исследованиях показано, что присутствие МСК усиливает процессы размножения и дифференцировки В-лимфоцитов (6, 7, 8). Противоречия могут быть обусловлены как особенностями изучаемых объектов, так и различиями в условиях их культивирования. Во всех указанных работах источником МСК служили клетки костного мозга. Наряду с В-лимфоцитами донорской крови использовали клетки селезенки человека и мыши. В работе Amé-Thomas с соавторами (8) изучали действие МСК на В-клеточные линии. Применение лимфомных, лимфобластоидных и миеломных В-клеточных линий в качестве тест-объектов модулирующего действия МСК имеет ряд преимуществ. Такие линии стабильны, сохраняют основной дифференцировочный признак (способность синтезировать иммуноглобулины) и в отличие от монослойных культур МСК представляют собой суспензионные культуры. Цель настоящей работы состояла в изучении влияния МСК, полученных из жировой ткани человека, на пролиферацию клеток лимфобластоидной линии Namalva в зависимости от условий культивирования.

Материал и методы

Образцы подкожной жировой ткани были получены при информированном согласии от двух пациентов в ходе выполнения плановых хирургических операций по поводу злокачественных новообразований и от двух здоровых доноров. Согласно стандартной процедуре выделения МСК (9) ткань механически измельчали и выдерживали в 0,1% растворе коллагеназы (Sigma), приготовленном на среде α -MEM с 10 mM HEPES. Диссоциированные клетки отмывали от фермента с помощью центрифугирования и рассевали в вентилируемые культуральные флаконы при плотности 100–400 тыс. клеток на 1 см² (кл/см²). Через 24 часа заменяли среду, удаляли неприкрепившиеся ко дну клетки. Монослой прикрепившихся клеток по достижении 70-80% конфлюента пересеивали при плотности 5 тыс. кл/см². В экспериментах использовали клетки 3-5

пассажей. Поверхностные маркеры выявляли с помощью меченных флуорохромами антител против CD34, HLA-DR, CD29, CD44, CD90, CD105, CD73 на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (Becton-Dickinson) в соответствии с инструкцией производителя.

Линию лимфобластоидных клеток Namalva, полученную из Коллекции клеточных культур ИНЦ РАН, выращивали в среде DMEM/F12 с добавлением 5% сыворотки эмбрионов коров (Hyclone Defined). Для приготовления стандартной ростовой среды использовали сыворотку, хранившуюся при +4°C не более 3 мес. Для приготовления среды, дефицитной по ростовым факторам, использовали сыворотку того же происхождения, хранившуюся при +4°C в течение 12 мес. Все культуры выращивали в мультигазовом инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 20% O₂ (условия нормоксии) или 5% CO₂ и 5% O₂ (гипоксия).

Влияние МСК на клетки Namalva исследовали с помощью метода контактного сокультивирования. МСК рассеивали в ячейки 24-луночного планшета по 5 тыс кл/см². После прикрепления и распластывания МСК занимали 15-20% поверхности ячеек. Через сутки в те же ячейки вносили клетки Namalva в дозах 5, 10 или 50 тыс кл/мл. Контролем служили клетки Namalva, культивируемые без МСК. На 5 сутки после посева численность клеток в культурах определяли с помощью кондуктометрического счетчика Z1 (Beckman-Coulter). Счетчик был откалиброван для дифференцированного учета лимфобластоидных (меньших по размеру) и мезенхимальных (более крупных) клеток. Коэффициент размножения лимфобластоидных клеток вычисляли как отношение N5/N0, где N0 – посевная доза клеток, а N5 - количество клеток в культуре на 5 сутки. Все эксперименты были поставлены в 3–6 повторностях. На гистограммах представлены средние арифметические значения.

Результаты

При посеве клеток Namalva в дозах от 5 до 50 тыс. кл/мл в стандартной ростовой среде в условиях нормоксии наблюдали прямую зависимость величины коэффициента размножения от посевной дозы (рис 1). При дозе 2 тыс. кл/ мл за 5 суток культивирования численность клеток не нарастала, а при дальнейшем снижении плотности происходила гибель культур. Эти результаты определили выбор диапазона посевных концентраций клеток Namalva в последующих опытах.

При культивировании в среде, дефицитной по ростовым факторам, пролиферацию клеток *Namalva* наблюдали только в случае, если плотность посева превышала 10 тыс. кл/мл (рис. 1).

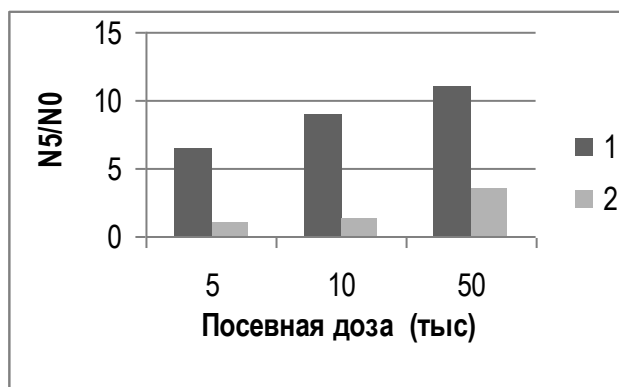


Рис.1. Влияние дефицита ростовых факторов на коэффициент размножения клеток *Namalva* при культивировании в условиях нормоксии. 1- стандартная культуральная среда; 2- среда, дефицитная по ростовым факторам.

Снижение концентрации O_2 до 5% при культивировании клеток в стандартной ростовой среде стимулировало их пролиферацию. Прирост численности клеток в условиях гипоксии был в 1,3-1,9 раза больше, чем при нормоксии. Стимулирующий эффект гипоксии проявлялся только при выращивании клеток в среде, содержащей сыворотку, богатую ростовыми факторами. При использовании среды, дефицитной по ростовым факторам, и посевной дозе ниже 10 тыс. кл/мл гипоксия приводила к снижению плотности культуры и её гибели (рис. 2).

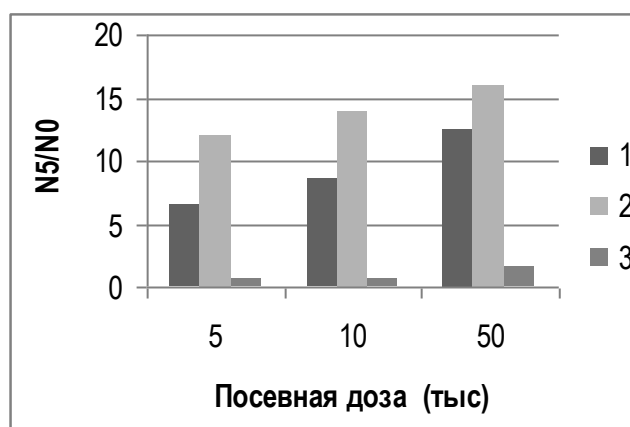


Рис.2. Влияние гипоксии и дефицита ростовых факторов на коэффициент размножения клеток *Namalva*. 1- культивирование в стандартной среде при нормоксии (контроль); 2- стандартная среда + гипоксия, 3- среда, дефицитная по ростовым факторам + гипоксия.

Культуры МСК, предназначенные для опытов по сокультивированию, характеризовали по экспрессии поверхностных маркеров (табл.1). Культуры МСК, обозначенные номерами 7 и 11, происходили из липоаспиратов здоровых доноров. Образцы культур МСК под номерами 6 и 8 были выделены из жировой ткани, иссеченной в ходе удаления злокачественных новообразований. Из данных, приведенных в таблице 1, следует, что по экспрессии основных маркеров культивируемые МСК пациентов не отличались от клеток доноров.

Таблица 1. Экспрессия поверхностных маркеров на МСК жировой ткани, использованных в опытах по сокультивированию с клетками Namalva.

Антиген	Процент клеток, экспрессирующих антиген в культурах МСК			
	№ 7	№ 11	№ 6	№ 8
CD44	88,6*	95,5	93,9	85,5
CD73	93,8	94,4	93,3	94,6
CD90	96,0	94,4	98,6	99,4
CD105	75,1	91,8	85,4	86,1
CD34	1,0		1,8	1,2
HLA-DR	0,2	0,2	0,6	0,1

При сокультивировании с МСК в течение первых суток после посева клетки Namalva оседали на дно ячеек, концентрировались вокруг МСК и прикреплялись к ним настолько плотно, что при осторожном перемешивании содержимого ячеек на орбитальном шейкере не переходили в суспензию. Если посевная доза составляла 50 тыс. кл/мл, лимфобластоидные клетки полностью маскировали распластанные МСК, оставляя свободной только поверхность, не покрытую монослойной культурой. На протяжении последующих дней пролиферирующие клетки формировали на поверхности МСК трехмерные колонии. По мере роста колоний часть клеток Namalva переходила в суспензию. На 5 сутки сокультивирования пипетирование позволяло перевести в суспензию незначительную часть лимфобластоидных клеток. Для полного перевода в суспензию лимфобластоидных клеток в ячейки наливали стандартный раствор трипсина (фирмы Биолот) и инкубировали при комнатной температуре под контролем инвертированного микроскопа. При этом наряду с клетками Namalva с поверхности удаляли часть МСК. Ферментативную активность трипсина ингибировали, перенося клеточную суспензию в среду DMEM с добавлением 10% сыворотки. Суспензии,

полученные на всех этапах, объединяли и брали пробы для определения в них количества клеток.

Сокультивирование клеток Namalva с МСК в стандартной ростовой среде в условиях нормоксии стимулировало пролиферацию лимфобластоидных клеток. Коэффициент размножения в смешанной культуре увеличивался при всех посевных дозах, эффект был наиболее значим при минимальной из использованных доз (рис. 3).

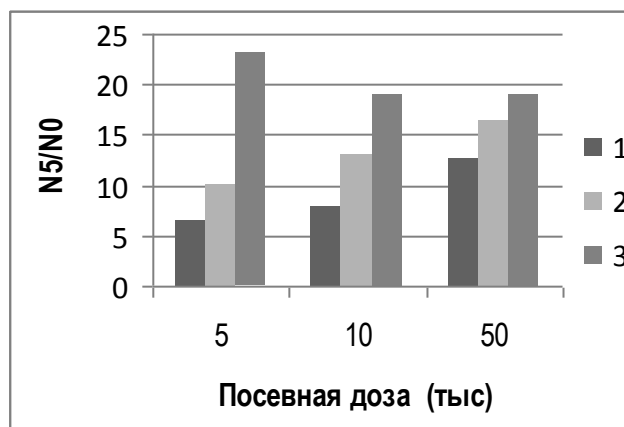


Рис. 3. Влияние МСК на пролиферацию клеток Namalva в стандартной ростовой среде в условиях нормоксии или гипоксии. 1- культура Namalva при нормоксии; 2- сокультивирование Namalva с МСК при нормоксии; 3-сокультивирование Namalva с МСК при гипоксии. Представлены средние значения, полученные для четырех культур МСК от разных индивидуумов.

В экспериментах были использованы две культуры МСК, полученные из липоаспираатов здоровых доноров и две культуры, выделенные из подкожной жировой клетчатки пациентов. Стимуляцию пролиферации клеток Namalva наблюдали при культивировании с МСК всех четырех культур.

Влияние МСК на клетки Namalva при культивировании в среде, бедной ростовыми факторами, было изучено как в условиях нормоксии, так и в атмосфере с пониженным содержанием кислорода.

Совместное культивирование с МСК частично компенсировало эффект дефицита ростовых факторов сыворотки и обеспечивало выживание лимфоидных клеток и их пролиферацию (рис. 4).

Как было показано выше, гипоксия угнетала пролиферацию клеток Namalva, культивируемых в среде, бедной ростовыми факторами. Присутствие МСК в такой среде компенсировало негативный эффект гипоксии (рис. 5).

Обсуждение

Постоянные линии, происходящие из В-лимфоцитов человека, в течение нескольких десятилетий используются как экспериментальные модели при изучении биологии В-лимфоцитов, процессов их злокачественной трансформации и механизмов синтеза иммуноглобулинов (10, 11, 12).

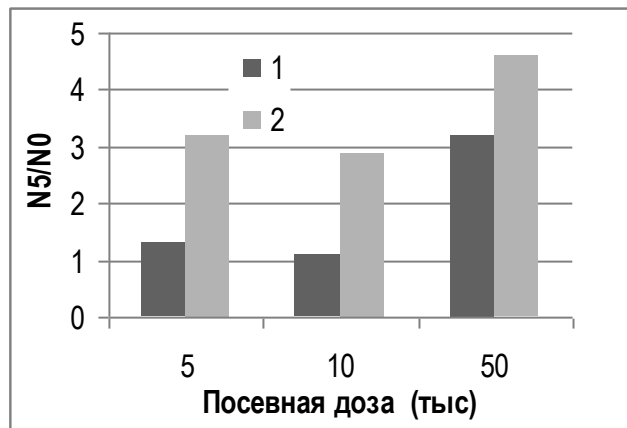


Рис.4. Влияние МСК на пролиферацию клеток Namalva при нормоксии в среде, дефицитной по ростовым факторам. 1- культура Namalva; 2-сокультивирование Namalva с МСК.

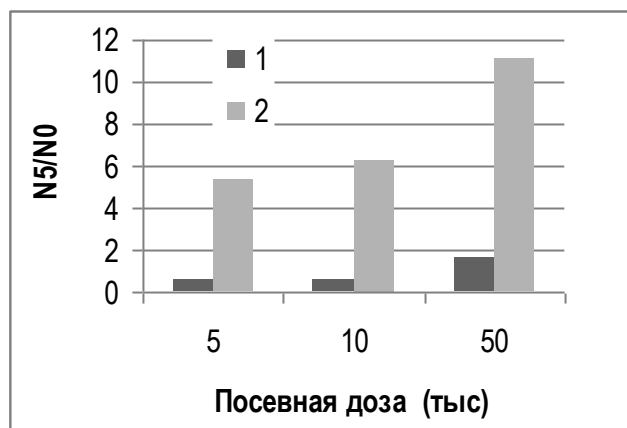


Рис.5. Влияние МСК на пролиферацию клеток Namalva при гипоксии в среде, дефицитной по ростовым факторам. 1- культура Namalva; 2-сокультивирование Namalva с МСК.

Известны единичные работы, в которых изучали влияние МСК на лимфомные или лимфобластоидные клетки В-клеточных линий (8, 13). Многообразие таких линий, иммортализованных на разных стадиях дифференцировки, заставляет уделять серьезное внимание оптимизации условий культивирования. Полученные в настоящей

работе данные указывают на то, что пролиферация клеток Namalva более всего зависит от плотности посева и от ростовых факторов сыворотки. В ходе настоящей работы установлено, что сильное стимулирующее действие оказывает снижение концентрации кислорода до 5%, что ранее не было известно и во многих прежних исследованиях не учитывалось.

Наибольшую стимуляцию пролиферации клеток Namalva наблюдали при сочетании богатой ростовыми факторами (стандартной) культуральной среды и гипоксии. В этих условиях практически нивелировалась зависимость скорости размножения от плотности посева. Важно подчеркнуть, что гипоксия оказывала положительное влияние только при наличии полноценной ростовой среды. При использовании среды, дефицитной по ростовым факторам, в условиях гипоксии клетки Namalva либо практически не размножались, либо погибали.

Присутствие монослоя МСК стимулировало пролиферацию клеток Namalva. Коэффициент размножения был наибольшим при сокультивировании на полноценной ростовой среде в условиях гипоксии. В среде, дефицитной по ростовым факторам, гипоксия угнетала пролиферацию клеток Namalva. Присутствие МСК в такой среде компенсировало ингибирующий эффект гипоксии. Таким образом, в целом полученные результаты позволяют сделать вывод о стимулирующем действии МСК на клетки линии Namalva. При этом активность МСК, выделенных от пациентов с новообразованиями, была такой же, какую проявляли клетки здоровых доноров.

В настоящей работе получены данные об установлении тесных контактов между МСК и лимфобластоидными клетками Namalva. Эти наблюдения дополняют опубликованные ранее сообщения о контактном взаимодействии МСК с кардиомиоцитами (14) или Т-лимфоцитами (15) и позволяют думать, что выявляемая при сокультивировании склонность МСК к установлению тесных контактов с клетками разных линий дифференцировки представляет собой универсальное свойство, которое может проявляться и в условиях целостного организма.

Список литературы

1. **Uccelli A., Moretta L., Pistoia V.** Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.*, 2006, 36: 2566-2573.

2. **Кругляков П.В., Лохматова Е.Л., Климович В.Б., Зарицкий А.Ю.** Мезенхимные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2006, 1 (3): 36-41.
3. **Shi M., Liu Z.W., Wang F.S.** Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol., 2011, 164:1-8.
4. **Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., Uccelli A.** Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood 2006, 107: 367–372.
5. **Schena F., Gambini C., Gregorio A., Mosconi M., Reverberi D., Gattorno M., Casazza S., Uccelli A., Moretta L., Martini A., Traggiai E.** Interferon- γ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2010, 62: 2776-2786.
6. **Traggiai E., Volpi S., Schena F., Gattorno M., Ferlito F., Moretta L., Martini A.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. Stem Cells. 2008, 26: 562-569.
7. **Rasmusson I., Le Blanc K., Sundberg B., Ringden O.** Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. Scand. J. Immunol. 2007. 65: 336–343.
8. **Amé-Thomas P., Maby-E.I. Hajjami H., Monvoisin C., Jean R., Monnier D., Caulet-Maugendre S., Guillaudeux T., Lamy .T., Fest T., Tarte K.** Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. Blood. 2007, 109: 693-702.
9. **Zuk, P.A. P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J.I., Futrell, W.J., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001. 7: 211–226.
10. **Sie L, Loong S., Tan E.K.** Utility of lymphoblastoid cell lines. J. Neurosci. Res. 2009, 87:1953-1959.
11. **Самойлович М.П., Пиневиц А.А., Вартанян Н.Л., Климович В.Б.** Продукция IgM и J-цепи В-лимфобластоидными клеточными линиями. Клеточные культуры. Инф. бюллетень. 2010, вып. 25: 15-23.
12. **Ballou M., Wang W., Xiang S.** Modulation of B-cell immunoglobulin synthesis by retinoic acid. Clin. Immunol. Immunopathol. 1996, 80: 73-81.
13. **Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Spagnoli G., Braccini A., Bouchenaki M., Ceredig R. Pistoia V., Martin I., Tyndall A.** Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. Rheumatology. 2007, 46: 403-408.
14. **Plotnikov E.Y., , Khryapenkova T.G., Vasileva A.K., Marey M.V., Galkina S.I., Isaev N.K., Sheval E.V., Polyakov V.Y., Sukhikh G.T., Zorov D.B.** Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. J. Cell Mol. Med. 2008, 12:1622-1631.
15. **Suva D., Passweg J., Arnaudeau S., Hoffmeyer P., Kindler V.** In vitro activated human T lymphocytes very efficiently attach to allogenic multipotent mesenchymal stromal cells and transmigrate under them. J. Cell Physiol. 2008, 214: 588-594.