

УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

© М. Райдан,¹ Н. А. Шубин,¹ Н. С. Николаенко,¹ М. И. Блинова,¹
Г. Г. Прохоров,² Г. П. Пинаев¹

¹ Институт цитологии РАН и ² Международный институт криомедицины, Санкт-Петербург;
¹электронный адрес: raydanmazen@yahoo.com

На основе ранее проведенного исследования об устойчивости к холоду гетерогенной популяции кератиноцитов в зависимости от степени их дифференцировки изучали *in vitro* устойчивость стромальных клеток костного мозга (СККМ) крыс к холоду до и после их дифференцировки в адипогенном или остеогенном направлении. Показали, что СККМ после индукции дифференцировки наименее устойчивы к воздействию низких температур. Полученные данные могут послужить основой для дальнейшего изучения процессов и механизмов, влияющих на устойчивость СККМ к холоду в зависимости от степени их дифференцировки.

Ключевые слова: СККМ, адипоцитарная и остеогенная дифференцировка, низкая температура.

При воздействии холодом на органы и ткани организма исследователи обратили внимание на специфическую реакцию клеток разных типов. Авторы, изучавшие влияние низких температур на деструкцию клеток, заметили, что оптимальная скорость охлаждения для клеток различных типов различна (McGrath, 1974; Mazur, 1977; Teryman, 1974). По их мнению, эти различия могли зависеть от размера клетки, геометрии ее поверхности, содержания в ней воды и проницаемости плазматических мембран. Современные исследователи стали изучать процессы энтропии, предполагая, что они могут оказывать влияние на устойчивость клеток к воздействию холодом (Wolf, 2002). Это предположение остается и в настоящее время, а все основные подходы к лечению болезней с помощью криохирургии сформировались на основе данных классической криобиологии и методов, разработанных для криоконсервации клеток. Конкретные механизмы устойчивости клеток и тканей организма в процессе их охлаждения остаются в настоящее время неясными и требуют систематического изучения.

Ранее мы исследовали устойчивость к действию низких температур кератиноцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Полученные результаты показали, что стволовые и транзиторные клетки при оптимальных режимах охлаждения действительно обладают большей устойчивостью, в то время как дифференцированные при тех же условиях гибнут (Райдан и др., 2011), что согласуется с представлениями криохирургов о характере влияния низких температур на кожу человека. Далее встал вопрос о том, распространяется ли выявленная закономерность на другие клетки, находящиеся на разных стадиях дифференцировки, или она является характерной только для кератиноцитов.

В связи с этим настоящая работа посвящена изучению устойчивости стромальных клеток костного мозга

(СККМ) к низким температурам до и после их дифференцировки в адипогенном или остеогенном направлении. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стромальные клетки костного мозга в зависимости от степени их дифференцировки также различаются по степени их устойчивости к действию холода.

Материал и методика

Выделение СККМ крысы. В работе использовали беспородных крыс 2-месячного возраста. Животных усыпляли с помощью эфира, умерщвляли растягиванием позвоночника и стерилизовали в 70%-ном спирте в течение 10—15 мин. Для выделения костного мозга брали бедренные кости. Промывали их в фосфатном буфере (PBS) без кальция и магния с добавлением гентамицина (Invitrogen, Великобритания) в концентрации 50 мкг/мл, отсекали эпифизы и осторожно вымывали костный мозг при помощи шприца с иглой 23G. Для выделения ядродержащих клеток полученную смесь суспендировали в 2 мл PBS, наслаивали на 5 мл раствора гистобака (Sigma, США) с плотностью 1.077 г/мл и центрифугировали 20 мин при 800 g при комнатной температуре. Клетки, находящиеся в интерфазном слое гистобака (в основном ядродержащие), переносили в другую пробирку и центрифугировали в 10 объемах раствора PBS при 600 g в течение 15 мин при комнатной температуре для очистки от гистобака. Отмытые клетки переносили в пластиковые чашки Петри (Nunc, Дания) и культивировали в среде α MEM (Sigma, США), содержащей 10 % сыворотки эмбрионов коров (HyClone, США) и смесь пенициллина и стрептомицина (1 : 100; Invitrogen, Великобритания) при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Подсчет клеток проводили под инвертированным микроскопом с помощью камеры

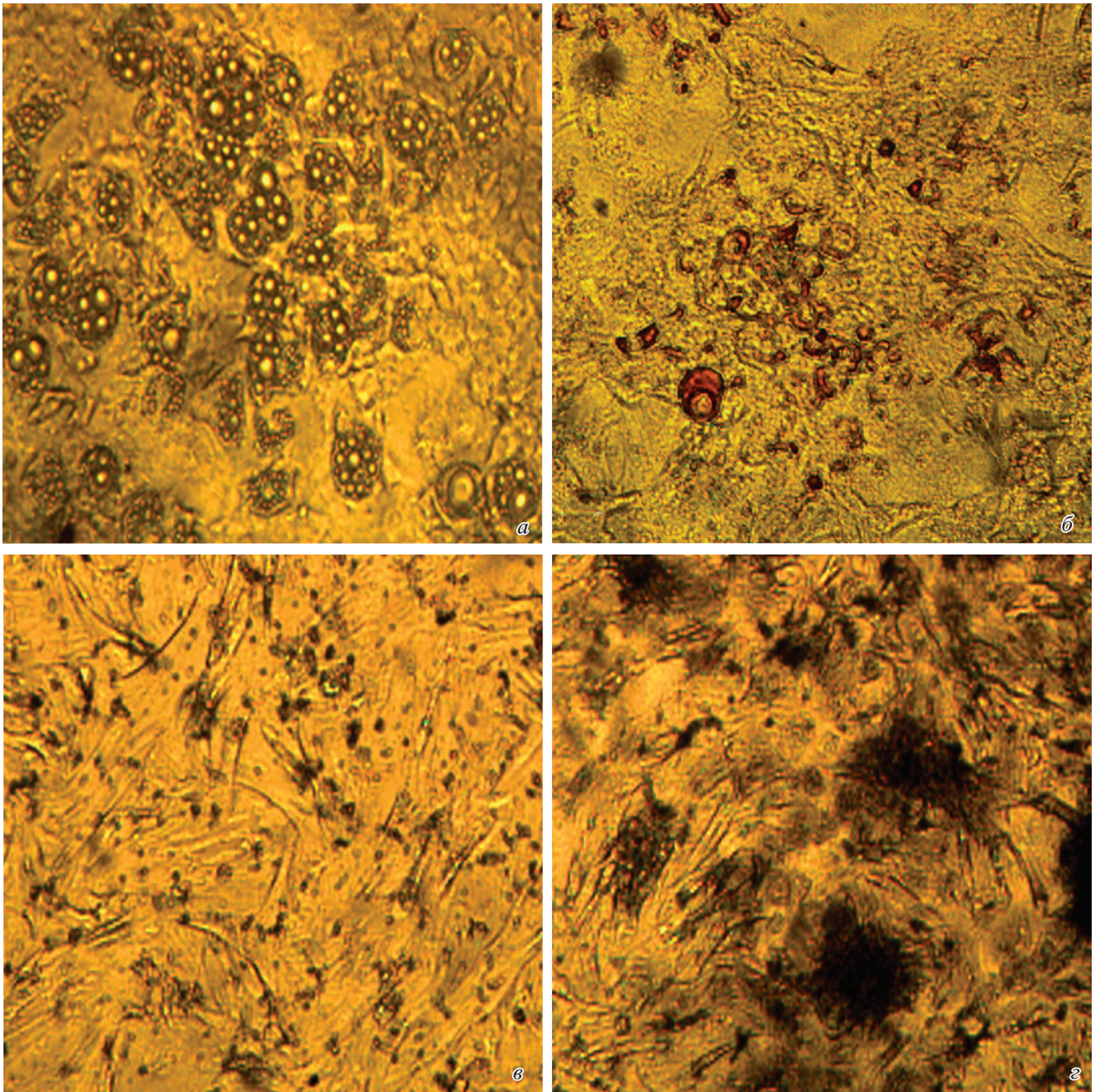


Рис. 1. Стволовые клетки костного мозга (СКММ) после дифференцировки в адипогенном или остеогенном направлении. а, б — фазовый контраст; в — гистохимическая окраска жировых капель с помощью жирового красного; з — гистохимическая окраска на щелочную фосфатазу с помощью смеси BCIP-NBT. Об. 10×.

Горяева. Клетки пересевали, используя смесь 0.25%-ного раствора трипсина и 0.02%-ного раствора ЭДТА в физиологическом буфере (Invitrogen, Великобритания).

Дифференцировка в адипоцитарном направлении. Для индукции адипогенной дифференцировки использовали описанный метод (Reyes et al., 2001). Суспензию СКММ ($2 \cdot 10^4$ кл./см²) культивировали в среде, содержащей 90 % среды αMEM, 10 % лошадиной сыворотки (Sigma, США), 50 мкг/мл гентамицина (Invitrogen, Великобритания), 10^{-9} М дексаметазона (Sigma, США), 50 мкг/мл аскорбината натрия (ICN, США), 1-кратный раствор ITS (100-кратный раствор, включающий в себя инсулин, трансферрин и селенит натрия в кон-

центрациях, не указанных фирмой-производителем) (Invitrogen, Великобритания) и 1-кратный раствор LA-BSA (100-кратный раствор, содержащий 1 мкг/мл линолевой кислоты и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина) (Sigma, США). Индукцию дифференцировки осуществляли в течение 2 нед. Смену среды проводили каждые 3—4 сут. Степень дифференцировки клеток оценивали по содержанию в них липидов (Reyes et al., 2001). Раствор жирового красного (Sigma, США) готовили непосредственно перед окрашиванием клеток. Для этого 0.5%-ный раствор красителя в изопропанолe разводили в соотношении 3:2 дистиллированной водой и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.2 мкм. Клетки промывали PBS,

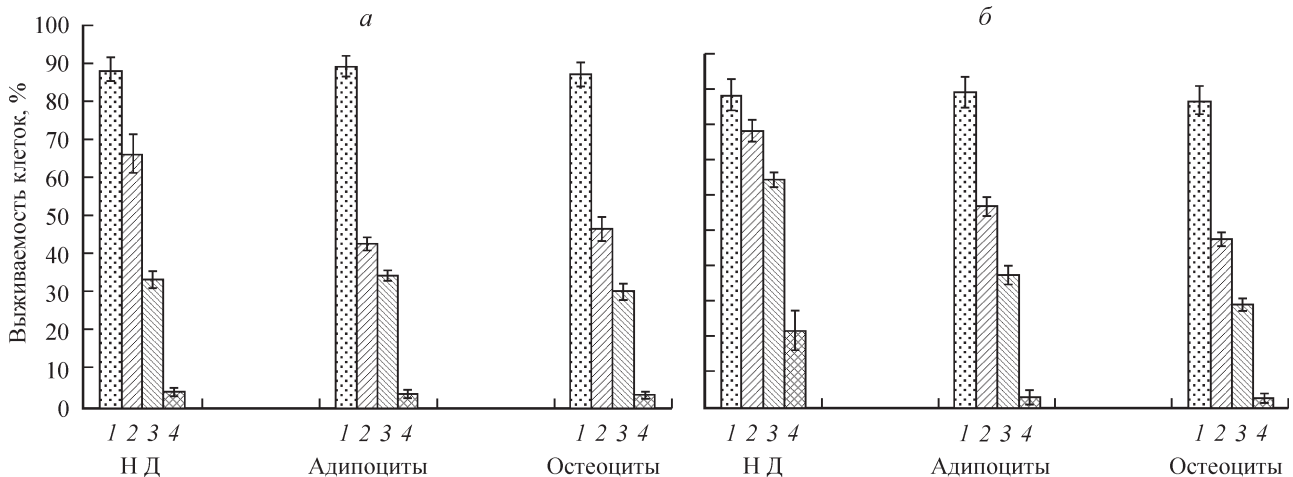


Рис. 2. Выживаемость недифференцированных (НД) и дифференцированных СККМ после охлаждения их до низких температур. Клетки, охлажденные в суспензии (а) или в осадке (б). Температура охлаждения, °С: 37 (1), -20 (2), -40 (3), -50 (4).

фиксировали метанолом в течение 2 мин при 20 °С, промывали 50%-ным этанолом и окрашивали раствором жирового красного в течение 10 мин. Окрашенные клетки снова промывали 50%-ным этанолом, ополаскивали дистиллированной водой и сушили на воздухе.

Дифференцировка в остеогенном направлении. Суспензию СККМ ($1 \cdot 10^4$ кл./см²) переносили в индуцирующую среду, содержащую 90 % α MEM, 10 % лошадиной сыворотки (Sigma, США), 50 мкг/мл гентамицина (Invitrogen, Великобритания), 10^{-8} М дексаметазона (Sigma, США), 50 мкг/мл аскорбината натрия (ICN, США) и 10 мМ β -глицерофосфата натрия (Sigma, США), и культивировали в течение 2 нед. Смену среды проводили через каждые 3—4 сут культивирования.

Степень дифференцировки клеток оценивали с помощью реакции на щелочную фосфатазу. Клетки 3 раза промывали PBS и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали 3 раза раствором PBS, после чего окрашивали на щелочную фосфатазу смесью BCIP-NBT (Sigma, США) в течение 20—40 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашенные препараты 3—4 раза промывали дистиллированной водой и высушивали.

Долю окрашенных клеток определяли методом фотокolorиметрического анализа. Клетки 2 раза промывали раствором PBS, затем фиксировали в 70%-ном этаноле в течение 30 мин, добавляли по 100 мкл раствора генциана фиолетового в каждую лунку на 30 мин. Затем промывали водой и высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Клетки лизировали 10%-ной уксусной кислотой в течение 15 мин, затем измеряли оптическую плотность с помощью анализатора «Charity» (ООО СКБ Пробанауч-прибор, Россия).

Действие низких температур. Свежевыделенные СККМ крыс культивировали в чашках Петри до второго пассажа, после чего индуцировали дифференцировку в адипогенном или остеогенном направлении. Затем культивируемые клетки переводили в суспензию. Далее клетки в виде суспензии, а также клетки в виде осадка, полученные после центрифугирования клеточной суспензии, подвергали охлаждению при разных температурах парами жидкого азота в криоампулах объемом 1.8 мл (NUNC, Дания) в камере программного заморажи-

вателя (Ice cube 1810, CSYLAB, Австрия) с электронным блоком контроля. Скорость охлаждения до температур -10, -20 и -30 °С составляла 5 °С/мин, а до -40 °С и ниже — до -12 °С/мин. Время нахождения клеток при конечной температуре всегда составляло 5 мин. Скорость охлаждения и время экспозиции выбраны на основании ранее проведенного нами исследования (Райдан и др., 2011).

Результаты

Так как через 3 нед культивирования в индуцирующей среде доля СККМ, дифференцированных в адипогенном (рис. 1, а, б) или остеогенном (рис. 1, в, г) направлении была максимальной, в эксперименты брали клетки после этого срока индукции.

Сначала действию низких температур подвергали исходные и дифференцированные стромальные клетки, находящиеся в суспензии. Фотокolorиметрический анализ клеточных популяций показал, что после охлаждения исходных СККМ при -20 °С доля клеток, способных к дальнейшему росту в культуре, оставалась около 70 %. При этих же условиях охлаждения суспензий СККМ, дифференцированных в адипогенном и остеогенном направлении, доля жизнеспособных клеток снижалась до 50 % от общего числа клеток.

При воздействии более низкой температуры (-40 °С) не было зафиксировано существенных различий по устойчивости к холоду между дифференцированными и недифференцированными СККМ. Доля клеток, способных к росту в культуре, во всех вариантах составляла 40 % от исходного количества.

Дальнейшее понижение температуры до -50 °С приводило клетки к гибели. Клетки полностью утрачивали способность к распластыванию и пролиферации (рис. 2, а). При одном и том же режиме охлаждения СККМ, находящиеся в осадке, сохраняли большее количество как дифференцированных, так и недифференцированных клеток, способных к росту в культуре, чем СККМ в состоянии суспензии.

Результаты фотокolorиметрического анализа показывают, что после охлаждения исходных СККМ в виде осадка при -20 °С доля жизнеспособных клеток была около 90, а при -40 °С — около 70 % от общего количества клеток.

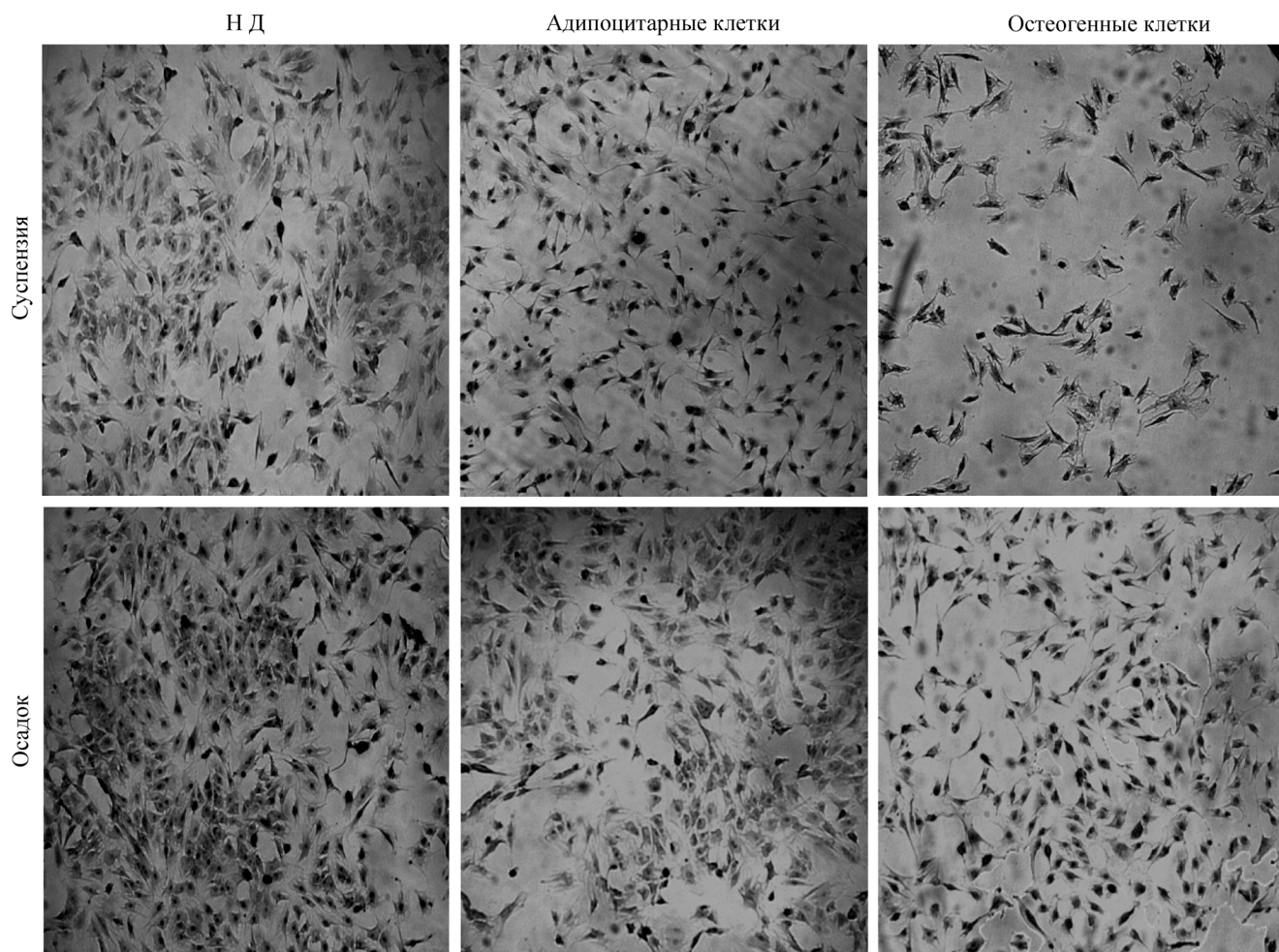


Рис. 3. Микрофотография дифференцированных и недифференцированных (НД) СККМ, сохранившихся после охлаждения. Видно, что плотность клеток при охлаждении до -40°C резко уменьшается во всех вариантах. Об. $10\times$.

При дальнейшем снижении температуры до -50°C незначительная часть клеток в осадке (20 %) все-таки выдерживала охлаждение, в то время как клетки в суспензии полностью погибли.

При охлаждении до -20°C СККМ с адипогенной дифференцировкой жизнеспособными оставались 70 % клеток, а при охлаждении до -40°C — около 50 %. СККМ, дифференцированные в остеогенном направлении, при охлаждении в осадке были менее устойчивы к действию холода. При воздействии на них температуры -20°C доля жизнеспособных клеток составляла 60 %, а при охлаждении до -40°C жизнеспособными оставались 40 % клеток (рис. 2, б). В то же время СККМ в осадке, дифференцированные в адипогенном и остеогенном направлениях, совсем не выдерживали охлаждения до -50°C и погибли.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что устойчивость СККМ к воздействию низких температур снижается после их дифференцировки в адипогенном или остеогенном направлении.

Обсуждение

В ходе ранее проведенных нами исследований клеток эпидермиса человека было обнаружено, что стволовые и транзиторные кератиноциты обладают значительно боль-

шей устойчивостью к действию низких температур по сравнению с дифференцированными клетками (Райдан и др., 2011). Причем они сохраняют эти различия как в культуре, так и в составе фрагментов кожи, что согласуется с наблюдениями криохирургов, использующих обработку поверхности кожи парами жидкого азота для ее омоложения. Однако при этом возникает вопрос о том, является эта устойчивость к холоду особенностью клеток кожи или она характерна и для других стволовых и прогениторных клеток. Для того чтобы получить ответ на этот вопрос, мы исследовали степень устойчивости к действию низких температур СККМ в их исходном состоянии и после направленной дифференцировки в адипогенном и остеогенном направлениях.

Как показали результаты данного исследования, СККМ действительно различаются по степени устойчивости к холоду в зависимости от степени их дифференцировки. Клетки, находящиеся в виде суспензии, после индукции дифференцировки в адипогенном или остеогенном направлении становятся менее устойчивыми к холодному воздействию. Но при понижении температуры до -40°C доля оставшихся жизнеспособных, как дифференцированных, так и недифференцированных клеток, снижается до 40 %. По всей вероятности, это может быть связано с тем, что при выбранном режиме охлаждения повреждаются одни и те же защитные системы клеток как у исходных СККМ, так и у дифференцированных, сохра-

нившиеся в процессе индукции дифференцировки. Поэтому избирательного воздействия охлаждения $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ мы не наблюдаем.

С другой стороны, клетки находящиеся в виде осадка, выдерживали более низкие температуры охлаждения, чем клетки, охлажденные в суспензии. Кроме того, большая устойчивость части недифференцированных СККМ к холоду ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) подтверждает наше предположение об изменении устойчивости СККМ после их дифференцировки.

Незначительные различия в устойчивости к холоду, полученные между адипогенными и остеогенными клетками при их охлаждении в виде осадка, могут быть связаны с различной степенью изменения защитных механизмов при индукции дифференцировки клеток в разных направлениях. Сравнительное изучение устойчивости остеоцитов и адипоцитов требует более детального изучения.

Результаты настоящего исследования полностью согласуются с нашими ранее полученными данными о повышенной устойчивости к действию холода стволовых и транзиторных кератиноцитов по сравнению с дифференцированными клетками (Райдан и др., 2011). При этом, однако, степень устойчивости к действию низких температур у клеток этих двух типов различается.

Так, например, оптимальный режим охлаждения суспензии кератиноцитов составлял $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 мин, для суспензии СККМ он был $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 мин, а для дифференцированных СККМ температура должна быть еще выше. Еще большие различия в устойчивости наблюдаются у клеток этих двух типов при охлаждении не в суспензии, а в виде осадка, где они могут взаимодействовать друг с другом. Так, кератиноциты в осадке выдерживали более низкий температурный режим ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 мин), чем СККМ в таком же состоянии ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 мин). Эти различия в степени устойчивости вполне понятны, так как разные клетки в зависимости от типа ткани и от их локализации в организме по-разному подвергаются воздействию изменений температуры окружающей среды и поэтому в разной степени адаптированы к низким температурам.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют утверждать, что стволовые клетки обладают повышенной устойчивостью к холоду по сравнению с дифференцированными клетками. При этом существенное значение имеют как режим охлаждения, так и состояние, в котором клетки подвергаются охлаждению (рис. 3).

В отличие от многочисленных работ, связанных с исследованием клеточных стрессов при гипертермии, работ по реакции клеток в ответ на гипотермию сравнительно мало (Holland et al., 1993). Изучать клеточную резистентность к холоду непросто, потому что она не контролируется определенным геном и связана с совокупностью разных факторов (Beck et al., 2004). К этим факторам относятся степень гидрофильности (или гидрофобности) клеточной мембраны (Scott et al., 2005; Byrant, Wolfe 1989), изменение структуры клетки в результате неравномерного осмотического стресса при охлаждении (Batysky et al., 1997), образование внутри и вне клетки кристаллов льда (Guenther et al., 2006; Mazur et al., 2008), обратимая и необратимая денатурация белков (Bischof et al., 2005), изменение синтеза и локализации внутриклеточных высокомолекулярных криопротекторов (Breton et al., 2000), в первую очередь белков теплового шока (HSP 70), при гипотермии (Alegna et al., 2005), а также клеточная дегидратация (Curry et al., 1994).

В настоящей работе выяснили, что степень дифференцировки у клеток СККМ также играет важную роль в их устойчивости к кратковременному воздействию низких температур. Для понимания причин повышенной устойчивости стволовых клеток к холоду чрезвычайно важно выявить, какие из перечисленных факторов важны для изменения устойчивости СККМ при дифференцировке.

Список литературы

- Райдан М., Шубин Н. А., Блинова М. И., Прохоров Г. Г., Пинаев Г. П. 2011. Влияние охлаждения до низких температур на жизнеспособность кератиноцитов кожи человека, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Цитология. 53(1) : 22—30.
- Alegna R., Paola T., Guillermo A., Mirian Strauss. 2005. Is hypothermia a stress condition in HepG2 cells? Expression and localization of Hsp 70 in human hepatoma cell line. Tissue and Cell. 37(1) : 59—65.
- Batycky R. P., Hammerstedt R., Edwards D. A. 1997. Osmotically driven intracellular transport phenomena. Phill. Trans. R. Soc. Lond. 355 : 2459—2488.
- Beck E. H., Heim R., Hansen J. 2004. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. J. Biosci. 29 : 449—459.
- Bischof J., He X. 2005. Physical aspects of cryobiology. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1066 : 1—22.
- Breton G., Danyluk J., Quillet F., Sarhan F. 2000. Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. Annu. Rev. 6 : 57—99.
- Byrant G., Wolfe J. 1989. The interaction and fusion of bilayers formed from unsaturated lipids. Eur. J. Biophys. 16 : 369—374.
- Curry M. R., Millan J. D., Watson P. F. 1994. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. Biol. Reprod. 51 : 1014—1021.
- Guenther J. F., Seki S., Kleinhans F. W., Edashige K., Roberts D. M., Mazur P. 2006. Extra- and intra-cellular ice formation in Stage I and II *Xenopus laevis* oocytes. Cryobiology. 52 : 401—416.
- Holland D., Roberts S., Wood E., Cunliffe W. 1993. Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 101 : 196—199.
- Mazur P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology. 14 : 251—272.
- Mazur P. 1998. Physical and chemical factors underlying cell injury in cryosurgical freezing. USA. Cryosurgical treatment. Springfield. 556 p.
- Mazur P., Kleinhans F. W. 2008. Relationship between intracellular ice formation in oocytes of the mouse and *Xenopus* and the physical state of the external medium — a revisit. Cryobiology. 56 : 22—27.
- Mc Grath J. J., Cravalho E. G. 1974. Hela cell freezing injury: intracellular ice formation injury and survival as function of cooling velocity. Cryobiology. 11 : 549—556.
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C. M. 2001. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood. 98 : 2615—2625.
- Scott K. L., Lecak J., Acker J. P. 2005. Transfusion. Med. Rev. 19 : 127—142.
- Teryman H. T. 1974. Freezing injury and its prevention in living cells. Annu. Rev. Biophys. Biochem. 3 : 341—363.
- Wolfe A. 2002. Cellular thermodynamics. Encyclopedia of life Science. A1363: 1—12.

STABILITY OF BONE MARROW STROMAL CELLS TO LOW TEMPERATURES ACCORDING
TO THEIR DEGREE OF DIFFERENTIATION

M. Raydan,¹ N. A. Shubin,¹ N. S. Nikolayenko,¹ M. I. Blinova, G. G. Prokhorov,² G. P. Pinaev¹

¹ Institute of Cytology RAS and ² International Institute of Cryomedicine, St. Petersburg;
¹ e-mail: raydanmazen@yahoo.com

On the bases of earlier conducted research about the stability of heterogeneous population of keratinocytes to low temperatures according to their stages of differentiation this experiment' studies *in vitro* the stability to low temperatures of rat bone marrow stromal cells before and after their adipocyte and osteocyte differentiation. Results show that bone marrow stromal cells after their differentiation into either adipocytes or octeocytes became least stable to low temperatures. Findings may serve as foundation for further studies that may explain the changes of processes and mechanisms that play a major role in BMSC stability to low temperatures according to their stage of differentiation.

Key words: BMSC, adipocyte and osteocyte differentiation, low temperatures.
