

4-СУТОЧНЫЙ РИТМ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРЫ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ C57BL/6

Диатроптова М.А., Пономаренко Е.А.
ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Россия, Москва

В настоящее время инфрадианные (многосуточные) ритмы установлены в динамике многих эндокринологических и иммунологических параметров. Ранее нами выявлен 4- и 12-суточный ритмы изменения митотического индекса эпителия пищевода у самцов крыс Вистар и японских перепелов (Диатроптов М.Е., Макарова О.В., 2015). Однако факторы, влияющие на формирование инфрадианных биоритмов не установлены, предполагают, что они электромагнитной природы (Мартынюк В.С., 2009). Так как на митотическую активность клеток организма влияет множество гуморальных факторов среды организма, целесообразно их изучение на культуре клеток. Вопрос об изменении пролиферативной активности культивируемых клеток в инфрадианном диапазоне биоритмов остается открытым. В связи с чем была оценена динамика пролиферативной активности фибробластоподобных эмбриональных клеток, находящихся в логарифмической фазе роста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фибробластоподобные клетки выделяли из эмбрионов мышей C57Bl/6 на 12-13 день внутриутробного развития. Самок выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков. Брали ткани эмбрионов без внутренних органов и головы. Для выделения клеток использовали метод ферментативной дезагрегации: эмбрионы помещали в чашку Петри (диаметр 6 см) с 2 мл 0,25% трипсина («ПанЭко» Россия), измельчали на кусочки размером 1-0,5мм, после этого добавляли 3 мл трипсина и инкубировали в термостате при 37°С 15-30 мин, каждые 5 минут пипетировали. Затем центрифугировали 7 мин при 1000 об/мин (r=9 см), осадок ресуспендировали в среде с 10 % фетальной бычьей сывороткой. Клетки в количестве 1-2 млн в объеме 10 мл полной культуральной среды помещали в матрасы 25 см² на 4 часа, после чего среду сливали и добавляли новую. Через 3-5 дней после посева культуру пересеивали в новый флакон или использовали в опыте.Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с L-глутамином («ПанЭко» Россия) с добавлением 10% FBS (Biosera Франция) и 0,004 % гентамицина(ОАО Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь) при 37°С во влажной атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO2. Для культивирования клеток использовали матрасы «Nunk» (США), чашки Петри «Erpendorf» (Германия). После субкультивирования клетки в количестве 300 тыс. высевали на 12-ть чашек Петри диаметром 6 см в объеме 5 мл среды. Для стандартизации эксперимента и постоянного наличия клеток в логарифмической фазе роста, посев клеток в чашки Петри проводили ежедневно в течение периода исследования (с 20 ноября по 11 декабря 2019г). Каждые последующие сутки с целью подсчета клетки снимали с 2-х чашек Петри путем трипсинизации: добавляли 2 мл 0,02 % химотрипсина, разведенного в растворе Версена, и инкубировали 4 мин при 37°С. Клетки подсчитывали в камере Горяева с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40 CFL («Zeiss» Германия). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета Statistica 6.0. Полученные данные выражали в виде медианы и интерквартильных размахов Me (Q25-Q75). Для выявления периодов инфрадианных ритмов подсчитывали коэффициент автокорреляции между исходным рядом и рядом, сдвинутым на 1, 2, 3 и 4 суток. С целью выявления синхронности изменения динамики изучаемых показателей рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена типичная кривая роста клеточной культуры. Для анализа вычисляли ежесуточное увеличение числа клеток на второй и третий день культивирования, когда культура находится в фазе логарифмического роста. Показатель ежесуточного увеличения численности клеток в культуре не был постоянным, а изменялся с 4-суточной ритмичностью на протяжении всего периода культивирования (рис. 2). Значения, вычисленные во второй и третий дни культивирования, имели сходную динамику ($r = 0.85$, $p < 0.0001$).

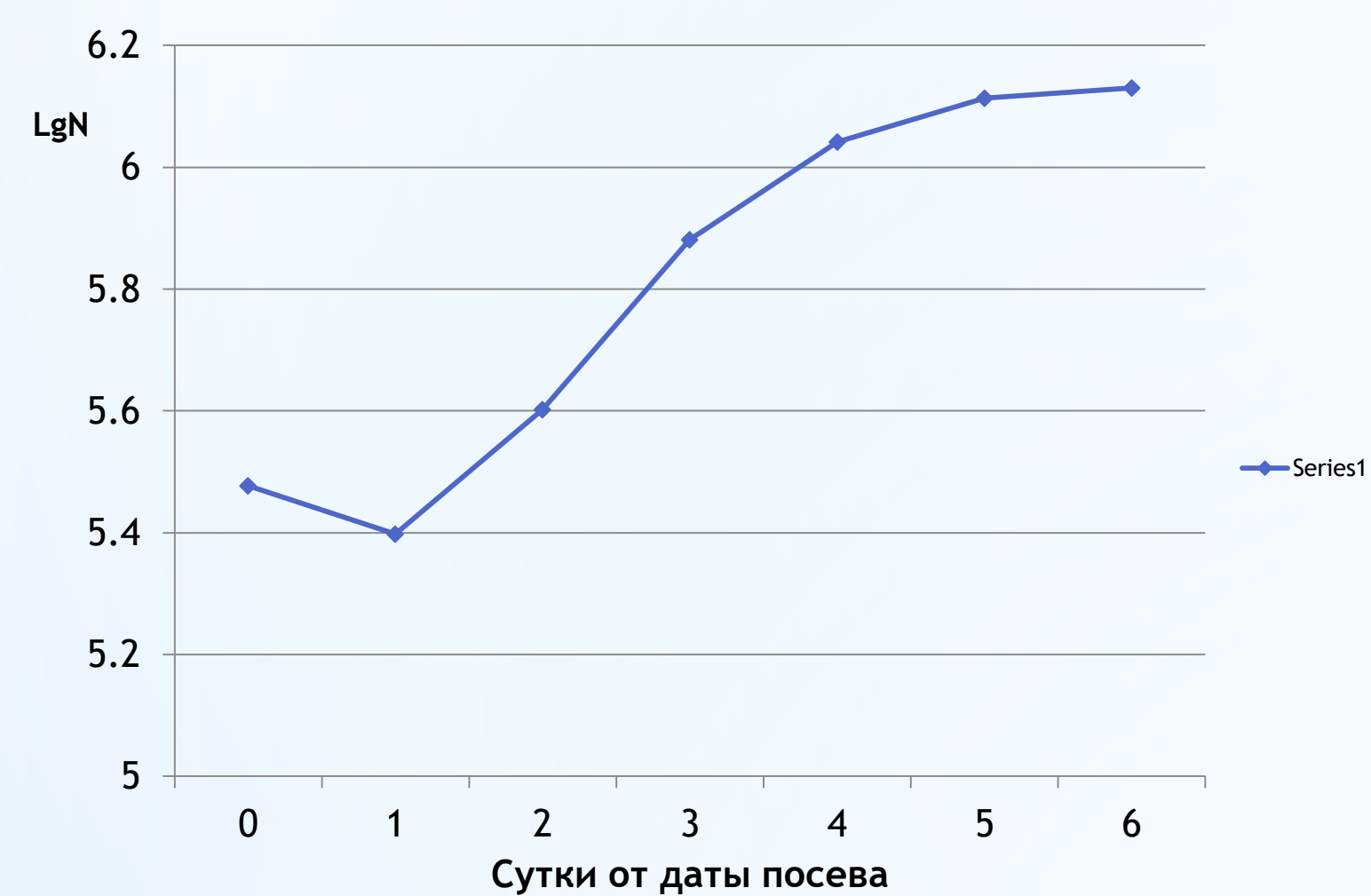


Рис. 1. Типичная кривая роста численности клеточной культуры эмбриональных фибробластоподобных клеток.

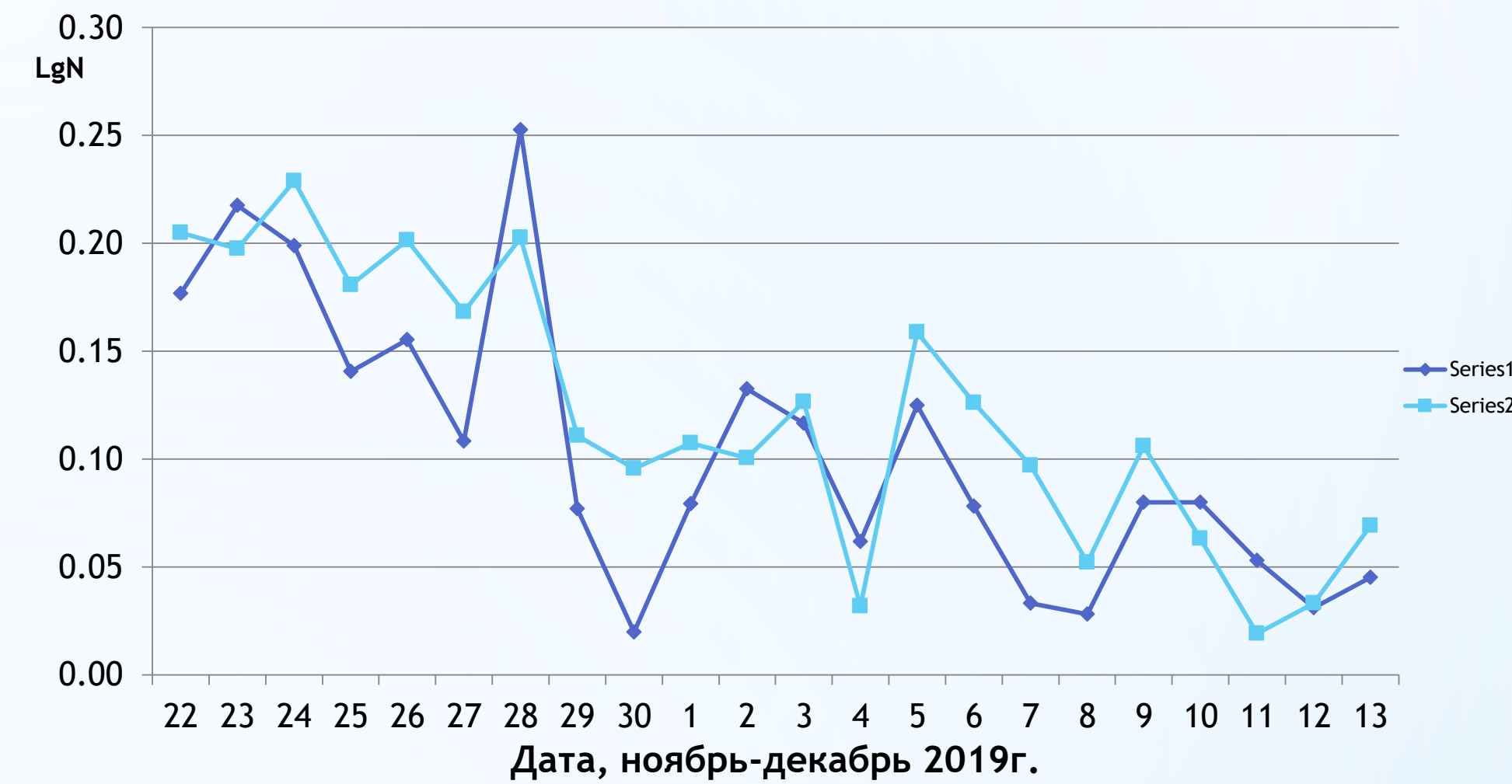


Рис. 2. Динамика ежесуточного прироста численности клеток в культуре, вычисленная во второй (ряд 1) и третий (ряд 2) дни культивирования.

Минимальные показатели были отмечены 26, 30 ноября, 4, 8 и 12 декабря, а максимальные: 24, 28 ноября, 2-3, 5-6 и 9-10 декабря. В первые 10 дней культивирования в акрофазе этого 4-суточного ритма ежесуточный прирост числа клеток в культуре составлял 0.21 (0.20; 0.24) лог. ед., а в батифазе – 0.12 (0.09; 0.16). Между показателями в акрофазе и батифазе установлено статистически значимое различие ($p = 0.02$). Во второй половине исследования ежесуточный прирост численности культуры снизился, но значения в акрофазе – 0.09 (0.09; 0.13) и батифазе – 0.03 (0.03; 0.05) 4-суточного ритма сохранили статистически значимое различие ($p = 0.004$).

В процессе культивирования показатели ежесуточного увеличения численности клеток постепенно снижались. Поэтому, с целью выявления статистической значимости 4-суточного периода были вычислены отклонения показателей увеличения численности клеток от аппроксимирующей линии тренда (рис.3). Коэффициент автокорреляции между исходным рядом и рядом, сдвинутым на 1 сутки составил $r = -0.07$ ($p = 0.73$); на 2 суток – $r = -0.36$ ($p = 0.11$); на 3 суток – $r = 0.002$ ($p = 0.99$) и на 4 суток – $r = 0.49$ ($p = 0.04$), что подтверждает статистическую значимость выявленного периода.

В динамике прироста численности культуры эмбриональных фибробластоподобных клеток 12-суточного ритма выявлено не было. Вероятно, 12-суточный ритм митотической активности наблюдается только в организме и связан с взаимодействием нескольких регуляторных процессов.

Тот факт, что в культурах, полученных от разных животных, фаза 4-суточного ритма пролиферативной активности клеток синхронна и не зависит от момента ее выделения, указывает на наличие внешнего фактора среды, синхронизирующего этот биоритм. В настоящее время установлено влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на пролиферативную активность клеток, в частности облучение суспензии Т- и В-лимфоцитов электромагнитным излучением (42,2 ГГц, 1 мкВт/см² амплитудная модуляция 10 Гц) подавляло уровень бласттрансформации иммунокомпетентных клеток [Огай В.Б. и др. 2003], а in vivo у крыс аналогичное по характеристикам излучение влияло на пролиферацию клеток красного костного мозга [Зилов В.Г. и др., 2017]. В последнем исследовании, помимо низкочастотной модуляции электромагнитного излучения применялась ее левосторонняя круговая поляризация. Выявленные в этих работах закономерности указывают на принципиальную возможность регуляции пролиферативной активности клеток ритмическими электромагнитными колебаниями. Эта возможность подтверждается и исследованием, проведенным в высоких широтах, где колебания магнитного поля Земли наиболее выражены, в котором была показана связь изменения морфофункционального состояния клеточных культур с геомагнитными возмущениями [Белишева Н.К. и др. 1995].

Заключение. Таким образом, в пролиферативной активности культуры фибробластоподобных клеток, находящихся в фазе логарифмического роста, выявлен устойчивый 4-суточный ритм, сохраняющийся в течение трех недель. Следовательно, 4-суточный ритм митотической активности клеток определяется не только соответственным ритмом глюкокортикоидных гормонов, но и, очевидно, чувствительностью клеток к фактору внешней среды, синхронизирующему или определяющему этот инфрадианный ритм.

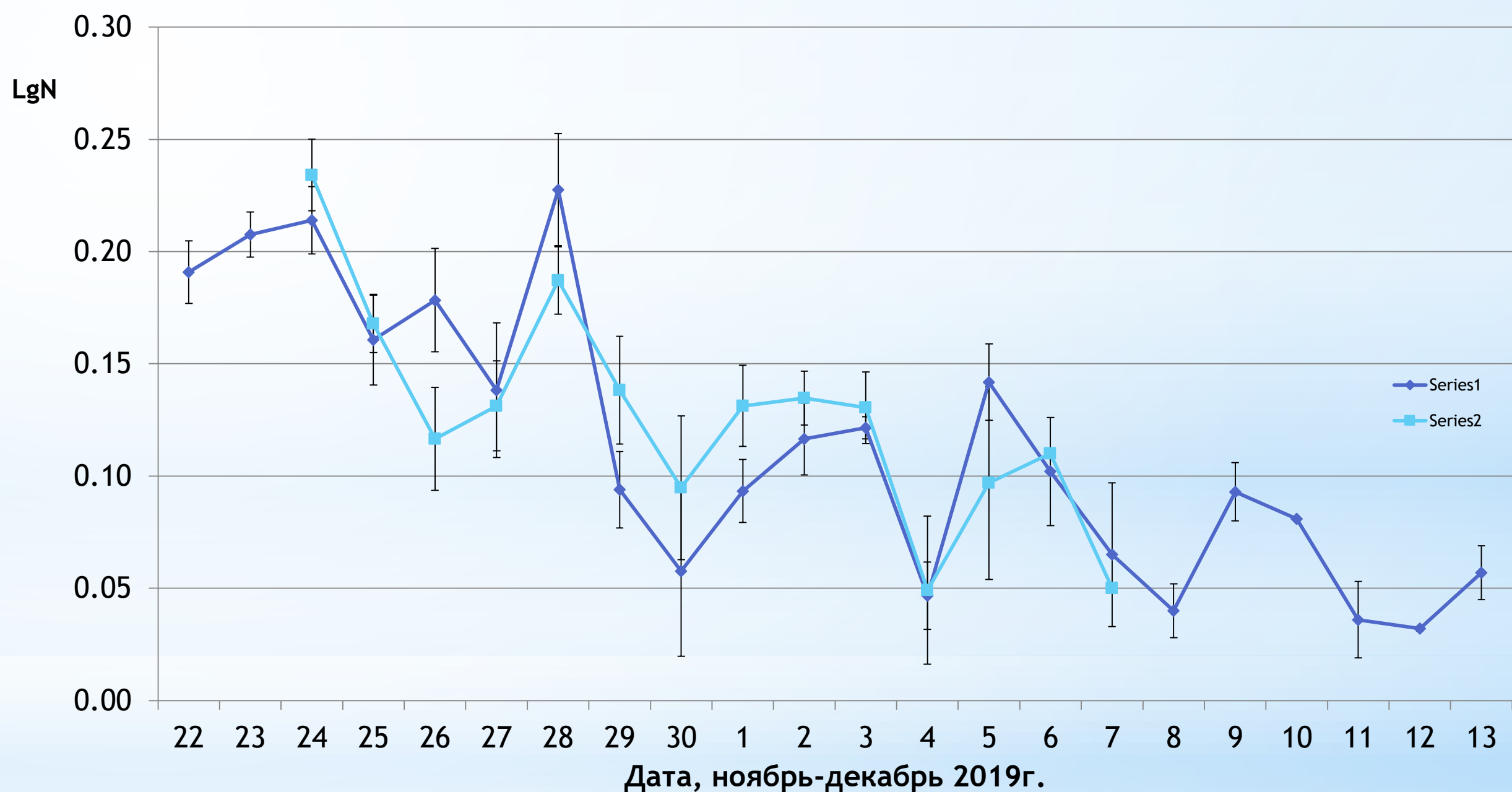


Рис.3 Динамика ежесуточного прироста числа клеток в период логарифмической фазы роста двух культур, полученных в разные фазы 4-суточного ритма: ряд 1 - 16 ноября, ряд 2 - 18 ноября.