

КОВАЛЬЧУК М. В.^{1,2}, ШУВАЛОВА Н. С.^{2✉}, КОРДЮМ В. А.^{1,2}¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: kovmv@ukr.net² ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67, e-mail: shuvalovanadiia@gmail.com

✉ shuvalovanadiia@gmail.com, (097) 253-15-00

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВНОСТІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЗА УМОВ ОКИСЛЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ

Мета. Окислювальний стрес вважається одним із основних пошкоджуючих факторів, що обмежує терапевтичний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Метою нашого дослідження було вивчення метаболічної активності МСК Вартонова студня людини різного донорського походження за умов окислювального стресу, індукованого перекисом водню.

Методи. МСК Вартонова студня людини були отримані методом експлантів та культивовані за загальноприйнятими методиками. Окисний стрес було викликано шляхом обробки клітин різними концентраціями перекису водню. Метаболічну активність МСК оцінювали за допомогою МТТ-тесту. **Результати.** Аналіз МТТ-тесту показав біфазну залежність відповіді МСК від концентрації H_2O_2 . Концентрації перекису водню від 6,25 до 50 мкМ підвищували рівень метаболічної активності МСК, а концентрації від 50 до 440 мкМ пригнічували метаболічну активність. Максимальний стимулюючий ефект спостерігався за концентрацій 12,5 мкМ та 25 мкМ залежно від донора. **Висновки.** Реакція клітин на окислювальний стрес відповідала гомотетичній залежності, а точки критичної концентрації та максимального стимулювання були індивідуальними для кожного донора.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, перекис водню, окислювальний стрес.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є перспективним джерелом клітин для регенеративної медицини завдяки їх високому потенціалу до самооновлення та імуномодулюючим та секреторним властивостям. Ці властивості роблять МСК привабливими кандидатами для лікування різних захворювань. Кількість клінічних випробувань МСК для подолання різноманітних захворювань зростає. Серед популяцій МСК особливо привабливими є МСК Вартонова студня через відсутність етичних протиріч в отри-

манні та використанні, унікальну паракринну активність та особливі імунологічні властивості [1].

Проте вплив ішемії, гіпоксії, інвазії запальних клітин та інших факторів на пошкоджені зони призводить до окислювального стресу. Вироблення надмірної кількості реактивних видів кисню за патологічних процесів пошкоджує МСК, тим самим понижуючи виживання клітин у зоні ураження, що значно обмежує їх застосування [2]. Виділення АФК (активних форм кисню) вважається нормальним процесом, і у клітин є механізми їх знешкодження. Але коли їх кількість досягає критичної точки, АФК через свою високу реакційну здатність стають досить небезпечними сполуками, які згубно впливають на клітину. H_2O_2 є однією з найважливіших АФК і може пошкоджувати клітини різними способами [3]. Досліди *in vitro* показали, що попередня обробка клітин низькими концентраціями перекису водню викликає адаптивний захисний ефект [4]. На сьогодні вплив АФК на МСК інтенсивно досліджується [5–7], проте відсутні дані щодо гетерогенності відповіді до окислювального стресу у МСК від різних донорів.

Тому метою пропонованого дослідження було дослідити реакцію МСК Вартонова студня різного донорського походження на окислювальний стрес, індукований додаванням у культуральне середовище H_2O_2 , у широкому інтервалі доз шляхом визначення метаболічної активності клітин за МТТ тестом.

Результати цього дослідження дадуть теоретичну основу для оптимального підбору схем підготовки МСК від різних донорів до трансплантації шляхом підвищення їх рівня виживання.

Матеріали і методи

Культури МСК отримували методом експлантів, як описано в наших попередніх роботах [8]. Усього в досліді було оброблено матеріал від 3-х новонароджених чоловічої статі.

Після досягнення клонами в первинній культурі розмірів, достатніх для пасування, клітини пасували за допомогою розчину трипсину (0,1 %) та версену (ЕДТА) (0,02 %), підраховували у камері Горяєва та аналізували експресію поверхневих маркерів (CD90, CD73, CD105). Аналіз здійснювали у відділі клітинних та тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України, як описано в наших попередніх роботах [8].

Культури МСК на наступних етапах дослідження культивували у середовищі α MEM з додаванням 100 од/мл пеніциліну («Артеріум») і 100 мкг/мл стрептоміцину («Артеріум»), та 10 % фетальної телячої сироватки (ФТС), далі – ростове середовище (РС).

Оцінку метаболічної активності клітин здійснювали за допомогою МТТ-тесту [9]. Клітини МСК на першому пасажі пасували за допомогою розчину трипсину (0,1 %) та версену (ЕДТА) (0,02 %), підраховували у камері Горяєва, та висівали в культуральній 96-лунковий планшет у кількості 5 тис. клітин на 1 лунку. Після 24 годин культивування середовище у лунках замінювали на РС, що містило різні концентрації перекису водню: 6,25 мкМ; 12,5 мкМ; 25 мкМ; 50 мкМ; 100 мкМ; 145 мкМ; 290 мкМ та 440 мкМ. та інкубували протягом 24 годин. Після закінчення експозиції у лунки додавали по 15 мкл розчину 0,5 % МТТ (броміду 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію). Планшет було інкубовано 4 години, після чого додавали по 200 мкл ДМСО для розчинення кристалів формазану. За допомогою аналізатора мікрофотокolorиметра Epsilon Research Limited MCC/340 визначали оптичну густину в лунках планшету за 540 нм.

Рівень метаболічної активності розраховували за МТТ-тестом у відсотках, як відношення середньої оптичної густини з кожної тестової лунки з окислювальним навантаженням до оптичної густини в контрольних лунках. Значення оптичної густини в контрольних лунках було прийнято як 100%.

Спостереження за культурами та їх візуальну оцінку проводили за допомогою мікроско-

па Leica DMIL, x200. У кожній точці розраховували середнє значення та стандартне відхилення (SD) і статистично аналізували за допомогою t-тесту Стьюдента; $p < 0,05$ вважали значущим.

Результати та обговорення

Рівень метаболічної активності клітин можна оцінити за інтенсивністю фізіологічних процесів. Одним із загальноприйнятих способів визначення метаболічної активності клітин є оцінка активності ферментів дегідрогеназ за допомогою тетразолієвих барвників – МТТ солей. Результатом є відновлення МТТ солей і їх перехід у водонерозчинну форму – формазан.

У ході експерименту було досліджено та порівняно між собою культури МСК, отримані від трьох різних донорів. Оцінка проліферативного потенціалу культур на першому пасажі показала, що культури не мали значущої різниці у рівні проліферації. Візуальна оцінка показала, що усі культури мали «класичну» фібробластоподібну морфологію. Досліджені культури було охарактеризовано за експресією поверхневих маркерів та встановлено, що в усіх випадках рівень експресії поверхневих маркерів був не нижчим від 90% (дані не наведено).

У ході досліді для індукування окислювального стресу з 30 % перекису водню були підготовлені такі концентрації в культуральному середовищі: 6,25 мкМ; 12,5 мкМ; 25 мкМ; 50 мкМ; 100 мкМ; 145 мкМ; 290 мкМ та 440 мкМ.

Після 24-годинної експозиції результати показали, що H_2O_2 може знизити загальну життєздатність клітин залежно від концентрації порівняно з контрольною групою. Проте нелінійний характер відповіді клітин на індукований окислювальний стрес змінювався в критичних точках дозової залежності. На рис. 1 продемонстровано зміну характеру відповіді як залежно від концентрації перекису водню, так і від походження клітинного матеріалу. В інтервалі концентрацій від 50 мкМ до 440 мкМ спостерігалося поступове зниження метаболічної активності, визначеної за МТТ-тестом, для трьох джерел МСК.

Інтервал низьких концентрацій (6,25 мкМ–50 мкМ) характеризувався дещо іншим характером відповіді на окислювальний стрес, який проілюстровано на рис. 2.

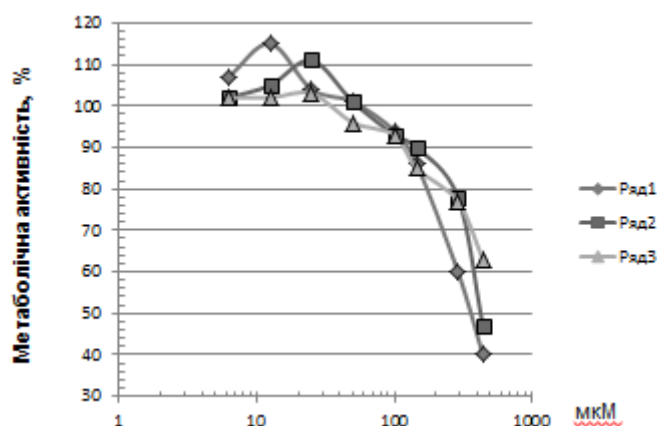


Рис. 1. Метаболічна активність (% від контролю за МТТ-тестом) МСК пуповини людини за дії різних концентрацій перекису водню в межах 6,25 мкМ–440 мкМ. Вісь X – логарифмічна шкала концентрацій H₂O₂. 1 ряд – МСК донора №1, 2 ряд – МСК донора №2, 3 ряд – МСК донора №3.

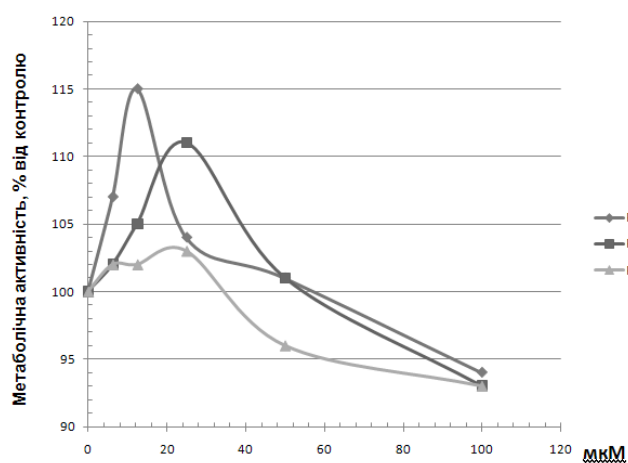


Рис. 2. Метаболічна активність (% від контролю) МСК пуповини людини за дії різних концентрацій перекису водню в інтервалі горметичної кривої залежності «ефект-концентрація». 1 ряд – МСК донора №1, 2 ряд – МСК донора №2, 3 ряд – МСК донора №3.

Аналіз метаболічної активності МСК в інтервалі низьких концентрацій вказує на стимулюючий ефект H₂O₂ та характерну горметичну криву залежності відповіді МСК на стрес від концентрації стресового агента. Графік в інтервалі низьких концентрацій чітко демонструє різницю у відповіді на горметик між МСК різних донорів. Зокрема, для МСК №1 та №2 критичною була концентрація 50 мкМ H₂O₂ (концентрація, за якої ще не виявляються негативні ефекти), тоді як для №3 – приблизно 35 мкМ, і клітини виявилися більш чутливими до стресу в зоні низьких концентрацій. Концентрації, при яких відбувався максимальний стимулюючий ефект, також відрізнялися залежно від донора.

Найбільший горметичний ефект був зафіксований у клітин №1 за впливу 12,5 мкМ H₂O₂, і він сягав 15 відсотків у порівнянні з контро-

лем; для зразка №2 горметична реакція була зміщена праворуч на графіку відповіді на рівень окислювального стресу, а стимулюючий ефект становив 11 % за впливу 25 мкМ H₂O₂. Клітини зразка №3 не відповідали на стимуляцію низького рівня окислювального стресу з високою достовірністю, та й у зоні високих концентрацій перекису водню клітини були також найбільш чутливими до стресу.

У підсумку отримані результати свідчать про те, що відповідь МСК на окислювальний стрес, індукований перекисом водню, в досліджуваних нами межах концентрацій 6,25 мкМ–440 мкМ характеризується двофазною горметичною реакцією «доза – відповідь». Принцип роботи, що стоїть за гормезисом, полягає в тому, що низький рівень стресу від фізичних, хімічних та біологічних стресових факторів часто

призводить до функціонального поліпшення клітин, тканин, органів та організмів – явище, яке називається фізіологічним гормезисом [10]. Тому отримані нами результати можуть бути інтерпретовані як прояв гормезису – зокрема стимулювання метаболічної активності клітин за низького рівня окислювального навантаження. Однак не всі клітинні зразки послідовно демонструють двофазну реакцію.

Виявлена гетерогенність відповіді МСК різних донорів на окислювальне навантаження середовища може бути обґрунтуванням для необхідності персоналізованого підходу до способів підготовки МСК для терапевтичних схем, що вимагають трансплантації клітин у зони з високим рівнем активних форм кисню (запалення, ішемія тощо). Зокрема, процес прекондиціонування МСК низьким рівнем активних форм кисню, який дозволяє трансплантованим кліти-

нам адаптуватися до більш високих рівнів, також вимагає індивідуалізації підходу залежно від точок максимального стимулювання та точок критичної концентрації.

Висновки

Отримані нами дані свідчать про те, що характер реакції МСК Вартонова студня на індукований окислювальний стрес може бути описаний за допомогою характерної горметичної кривої залежності відповіді на стрес від концентрації стресового агента, проте, точки критичної концентрації та максимального стимулювання були індивідуальними для кожного донора. Такі процеси, як прекондиціонування МСК перекисом водню з метою підвищення рівня їх виживання під час трансплантації, також вимагають персоналізації підходу залежно від точок максимального стимулювання.

References

1. Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J., Cetrulo C.L. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta*. 2011. Vol. 32, Suppl 4. S. 311–315.
2. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S., Byrne B.J., Kessler P.D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002. Vol. 105. P. 93–98. doi: 10.1161/hc0102.101442.
3. Denu R.A., Hematti P. Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. Vol. 2016. P. 9. doi: 10.1155/2016/2989076.
4. Sharma A., Singh M. Protein kinase C activation and cardioprotective effect of preconditioning with oxidative stress in isolated rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 2001. Vol. 219. P. 1–6.
5. Li D., Xu Y., Gao C.Y., Zhai Y.P. Adaptive protection against damage of preconditioning human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with hydrogen peroxide. *Gen. Mol. Res.* 2014. Vol. 13 (3). P. 7304–7317.
6. Bashiri H., Amiri F., Hosseini A., Hamidi M., Mohammadi Roushandeh A., Kuwahara Y., Jalili M.A., Habibi Roudkenar M. Dual preconditioning: a novel strategy to withstand mesenchymal stem cells against harsh microenvironments. *Adv. Pharm. Bull.* 2018. Vol. 8 (3). P. 465–470.
7. Nouri F., Nematollahi-Mahani S.N., Sharifi A.M. Preconditioning of Mesenchymal Stem Cells with Non-Toxic Concentration of Hydrogen Peroxide Against Oxidative Stress Induced Cell Death: The Role of Hypoxia-Inducible Factor-1. *Adv. Pharm. Bull.* 2019. Vol. 9 (1). P. 76–83.
8. Shuvalova N.S., Kordium V.A. Comparison of proliferative activity of Wharton jelly mesenchymal stem cells in cultures under various gas conditions. *Biopolym. cell.* 2015. Vol. 31, № 3. P. 233–239.
9. Van de Loosdrecht A.A., Beelen R.H., Ossenkoppele G.J., Broekhoven M.G., Langenhuijsen M.M. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukaemia. *J. Immunol. Methods.* 1994. Vol. 174 (1–2). P. 311–320.
10. Sedlic F., Kovac Z. Non-linear actions of physiological agents: Finite disarrangements elicit fitness benefits. *Redox. Biol.* 2017. Vol. 13. P. 235–243.

KOVALCHUK M.V.^{1,2}, SHUVALOVA N.S.², KORDIUM V.A.^{1,2}

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: kovmv@ukr.net*

² *The State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS Ukraine, Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshhorodska str., 67, e-mail: shuvalovanadiia@gmail.com*

PECULIARITIES OF THE METABOLIC ACTIVITY OF MESENCHIMAL STEM CELLS UNDER OXIDATIVE STRESS

Aim. Oxidative stress is considered to be one of the major damaging factors that limits the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs). The purpose of our work was to study the metabolic activity of Wharton jelly-derived MSC of different donor origin under oxidative stress conditions induced by hydrogen peroxide. **Methods.** MSC were obtained by the explant method and cultured according to standard methods. Oxidative stress was caused by treating cells with different concentrations of hydrogen peroxide. The metabolic activity of MSCs was evaluated using the MTT test. **Results.** Analysis of the MTT test showed a biphasic dependence of the MSC response to the concentration of

H₂O₂. Concentrations of hydrogen peroxide from 6.25 to 50 μM increased the level of metabolic activity of MSCs, and concentrations from 50 to 440 μM inhibited metabolic activity. The maximum stimulating effect was observed at concentrations of 12.5 μM and 25 μM depending on the donor. **Conclusions.** The response of cells to oxidative stress corresponded to the hormetic dependence, and the points of critical concentration and maximum stimulation were individual for each donor. Processes such as preconditioning MSCs with hydrogen peroxide to increase their survival rate during transplantation also require personalization of the approach depending on the points of maximum stimulation.

Keywords: mesenchymal stem cells, hydrogen peroxide, oxidative stress.