

УДК 616-092

Исследование миграции мезенхимных клеток FRSN в условиях низкоинтенсивной деформации сдвига, вызываемой постоянным потоком

Московцев А.А.^{1,2}, Колесов Д.В.¹, Мыльникова А.Н.^{1,3}, Кубатиев А.А.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И.Менделеева». 125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9

Поток жидкости оказывает значительное влияние на морфофункциональное состояние большинства клеток в организме. Это может проявляться в миграции клеток под действием сдвиговой деформации или градиента питательных веществ. Мезенхимные стволовые фибробластоподобные клетки FRSN были культивированы в условиях воздействия постоянного потока жидкости в микрофлюидном чипе. Проведены исследования миграции клеток на разных стадиях адгезии под действием потока в различных областях чипа. Обнаружены значительные перемещения клеток в режиме «stick-slip» вдоль направления потока.

Ключевые слова: фибробласты; мезенхимные стволовые клетки; миграция; микрофлюидика; сдвиговая деформация.

Для цитирования: Московцев А.А., Колесов Д.В., Мыльникова А.Н., Кубатиев А.А. Исследование миграции мезенхимных клеток FRSN в условиях низкоинтенсивной деформации сдвига, вызываемой постоянным потоком. *Патогенез*. 2018; 16(4): 144-147

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.144-147

Для корреспонденции: Московцев Алексей Александрович, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование: Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 13.07.2018

Study of FRSN cells migration under the conditions of continuous low flow

Moskovtsev A.A.^{1,2}, Kolesov D.V.¹, Mylnikova A.N.^{1,3}, Kubatiev A.A.^{1,2}

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Continuing Vocational Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

³ D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Miusskaya Ploshchad 9, Moscow, 125047, Russian Federation

The fluid flow exerts a significant effect on most cells in the body. This effect can involve cell migration under the action of shear stress or nutrient gradient. FRSN mesenchymal stem cells were cultured under the action of a constant fluid flow of low intensity in a microfluidic chip. The study of cell migration at different stages of adhesion was performed under the action of flow in different areas of the chip. Significant cell movements in a stick-slip mode along the flow direction were observed.

Key words: fibroblasts; mesenchymal stromal cell; migration; microfluidics; shear stress.

For citation: Moskovtsev A.A., Kolesov D.V., Mylnikova A.N., Kubatiev A.A. [Study of FRSN cells migration under the conditions of continuous low flow]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(4): 144-147 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.144-147

For correspondence: Moskovtsev Aleksey Alexanderovich, e-mail: bioinf@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 13.07.2018

Введение

Организм человека, как и большинство многоклеточных организмов, использует высокоэффективный массоперенос веществ для их доставки к клеткам с помощью

потоков биологических жидкостей через сосудистые системы. В этой связи, клетки в составе тканей, органов и систем в той или иной степени контактируют с потоком жидкости, который оказывает в том числе механическое

действие на клетки, компонентом которого является сдвиговая деформация. В то время как в кровеносной системе величина сдвиговой деформации может достигать 7 Па, интерстициальная жидкость характеризуется чрезвычайно низким потоком, обусловленным большим гидродинамическим сопротивлением внеклеточного матрикса. Величина воздействия сдвиговой деформации на клетки со стороны интерстициальной жидкости не превышает 0,01 Па [1]. Тем не менее, даже слабый поток оказывает влияние на морфофункциональное состояние клеток. Так, поток интерстициальной жидкости играет важную роль в функционировании адвентициальных клеток – малодифференцированные клетки кровеносных сосудов [2].

Сдвиговая деформация низкой интенсивности может индуцировать или менять клеточную подвижность. В рамках данной работы нами была исследована способность к миграции мезенхимных фибробластоподобных клеток FRSN на разных стадиях их адгезии к субстрату. При изучении воздействия сдвиговой деформации часто применяют технологии микрофлюидики. Однако зачастую их используют для исследования действия значительных величин сдвиговой деформации на высокоспециализированные механочувствительные клетки, такие как эндотелиоциты [3]. В нашей работе мы применили микрофлюидный подход для моделирования слабых величин сдвиговой деформации, соответствующих воздействию интерстициальной жидкости на фибробласты.

Материалы и методы исследования

Клетки. В работе были использована клеточная культура мезенхимных стволовых клеток FRSN (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия), имеющих фибробластоподобную морфологию, и близких по функциональным свойствам к фибробластам. Для FRSN характерно репликативное старение после 60 удвоений клеточной популяции, т.е. срок жизни культуры ограничен. Для культивирования FRSN была использована среда DMEM с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L-глутамин. Культивирование проводилось в инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO₂. Субкультивирование осуществлялось по достижении конfluence в полистироловых матрасах с площадью 75см². Субкультивирование проводилось с частотой раз в 2-3 дня. Для обновления культуры производилась ее криоконсервация. Для поддержания pH среды во время длительных экспериментов на воздухе её дополнительно забуферизовывали 20 мМ HEPES.

Оборудование. Исследование миграции клеток проводилось в микрофлюидных чипах для длительного культивирования (ООО «Микрофлюидные технологии», Москва, Россия) состоящих из 5 последовательно соединённых камер полукруглой формы объёмом 700 мкл каждая и высотой 200 мкм. Эксперименты проводили в мини-инкубаторе, обеспечивающем термостатирова-

ние по объёму. Поток ростовой среды в чипе обеспечивался многоканальной прецизионной системой подачи жидкостей Nemesys («Cetoni», Швейцария). Наблюдение за ростом и миграцией клеток производили с помощью инвертированного конфокального микроскопа EclipseTE 2000-u C1 («Nikon», Япония).

Результаты исследования и обсуждение

В подготовленную микрофлюидную систему загружали суспензию клеток FRSN концентрацией около 1,5 млн. клеток в 1 мл среды. Загрузка осуществлялась через специальный порт чипа с помощью одноразового шприца объёмом 1 мл. После заполнения внутреннего пространства первой камеры клеточной суспензией поддерживались статические условия, позволяющие клеткам седиментировать и начать адгезию к поверхности. Временной интервал статических условий варьировал в зависимости от скорости первичного прикрепления клеток к субстрату и составлял не более 40 минут. Начиная со стадии предварительной промывки чипа ростовой средой и в течение всех экспериментов, в мини-инкубаторе поддерживалась температура 37°C. После прохождения начальной фазы прикрепления клеток к поверхности в устройстве включали непрерывный поток среды со скоростью 0,5 мкл/мин. Нами был отмечен повышенный детачмент (открепление) клеток при использовании более высокой объёмной скорости. Фазу начального прикрепления клеток определяли по формированию псевдоподий и ведущего края клеток.

Согласно проведенным расчетам для данной конструкции чипов, адгезировавшие в камере и находящиеся в поддерживающем потоке (объёмная скорость до 0,5 мкл/мин) клетки подвергаются сдвиговой деформации не более 0,01 Па (в области «перешейка» между камерами), что не приводило к ухудшению выживаемости и роста клеток на длительных (более 72 часов) временных интервалах инкубации. Сдвиговая деформация в 0,01 Па существенно не меняла морфологию клеток, которая соответствовала таковой при статическом культивировании.

Нами установлено, что поток в существенной степени направляет и стимулирует движение адгезировавших, но нераспластанных фибробластов. Таким образом, данный тип перемещения, или ползания клеток, так называемый «stick-slip motion», может управляться потоком.

Нами был проведен анализ единичных треков перемещения клеток в течение 100 мин. в областях микрофлюидных чипов с разной величиной сдвиговой деформации, и была зарегистрирована анизотропия направлений перемещения клеток: в треках Y-проекции, коаксиальные с направлением потока, преобладали над X-проекциями, особенно в областях с высокими значениями линейной скорости потока – таких, как перемычки между камерами (рис. 1).

Для распластанных клеток поддерживающий поток приводил к миграции единичных клеток (рис. 2, трек помечен стрелкой) в течение 100 мин. При этом перемещения большинства клеток были невелики.

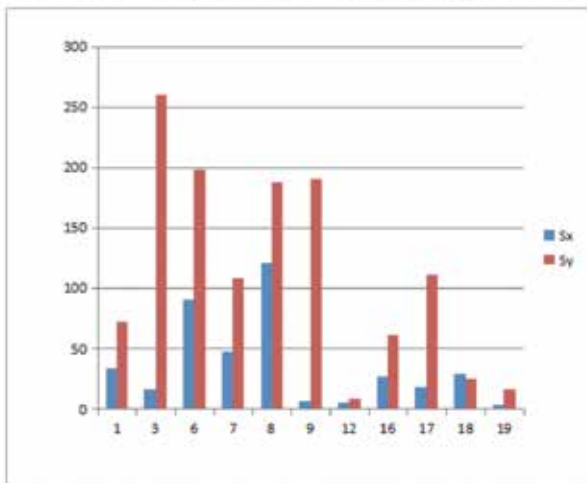
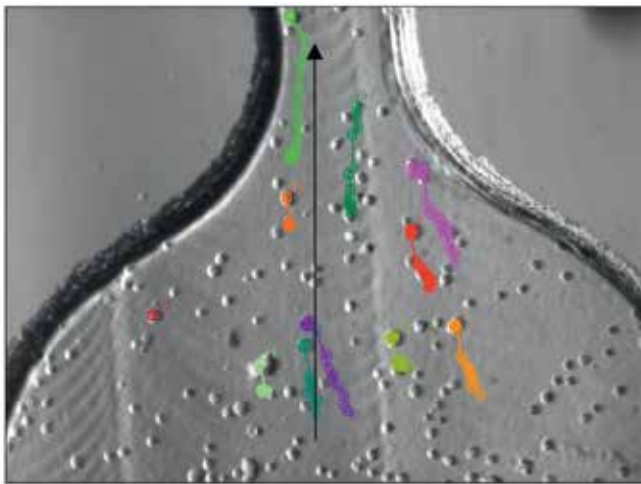


Рис. 1. Анализ подвижности клеток FRSN в микрофлюидном устройстве: вверху – треки направляемого потоком перемещения клеток в режиме «stick-slip motion», стрелкой показано направление потока; внизу – диаграмма X (Sx)- и Y (Sy)-проекций треков.

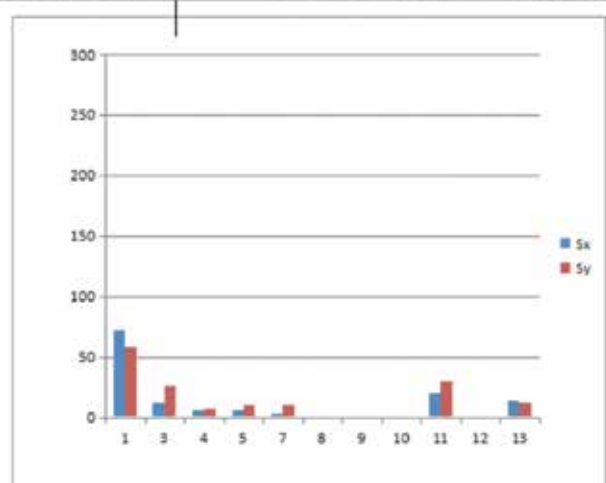
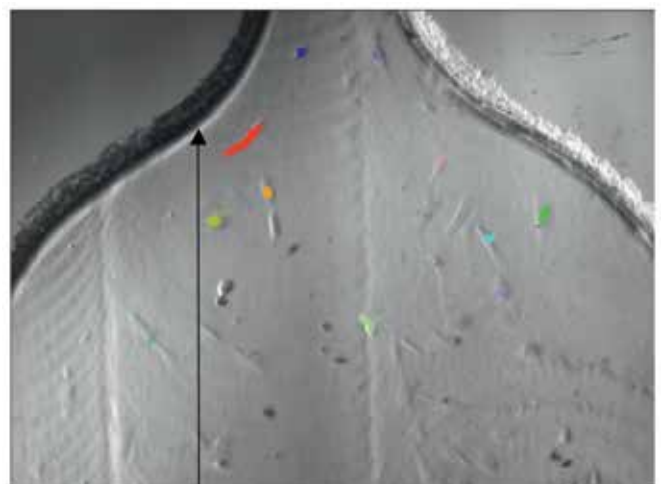


Рис. 2. Анализ подвижности распластанных клеток FRSN в микрофлюидном устройстве: вверху – треки клеток, стрелкой показано направление потока; внизу – диаграмма X (Sx)- и Y (Sy)-проекций треков

Заключение

На примере фибробластоподобных клеток FRSN – традиционной модели для изучения движения клеток – нами показано, что задаваемая геометрией микрофлюидного чипа сдвиговая деформация в результате действия потока способна направлять перемещение клеток. Наибольшая эффективность управления перемещением клеток достигается, когда клетки двигаются в режиме «stick-slip motion». При этом обнаруживается значительная анизотропия в направлениях миграции по и перпендикулярно потоку.

Список литературы

1. Swartz M.A., Fleury M.E. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2007; 9: 229-256. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151850
2. Sartore S., Chiavegato A., Faggin E., Franch R., Puato M., Ausoni S.,

Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ. Res.* 2001; 89(12): 1111-1121.

3. Колесов Д. В., Московцев А. А., Мильникова, А. Н., Савина, Г. Д., Соколовская, А. А., Кубатиев, А.А. Биомоделирование микрососуда в микрофлюидном чипе. *Патогенез.* 2016; 14(4): 4-8.

References

1. Swartz M.A., Fleury M.E. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2007; 9: 229-256. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151850
2. Sartore S., Chiavegato A., Faggin E., Franch R., Puato M., Ausoni S., Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ. Res.* 2001; 89(12): 1111-1121.
3. Kolesov D.V., Moskovtsev A.A., Mylnikova, A.N., Savina, G.D., Sokolovskaya, A. A., Kubatiev, A. A. [Biomodelling of the microvessel in a microfluidic chip]. *Patogenez. [Pathogenesis]*. 2016; 14 (4): 4-8. (in Russian)

Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; доцент кафедры общей патологии и патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Колесов Дмитрий Валерьевич – научный сотрудник лаборатории функциональной ангиопротеомики и метаболомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Мыльникова Алёна Николаевна – младший научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; аспирантка Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И.Менделеева»

Кубатиев Аслан Амирханович – доктор медицинских наук, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; заведующий кафедрой общей патологии и патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства Здравоохранения Российской Федерации