

ОЦЕНКА НА РАСТЕЖНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ФИБРОБЛАСТИ В УСЛОВИЯ НА СИМУЛИРАНА МИКРОГРАВИТАЦИЯ

Н. Стефанова, Р. Скробанска, Б. Арабаджиев

*Катедра „Цитология, хистология и ембриология“, Биологически ф-т на СУ „Св. Климент Охридски“, бул. „Драган Цанков“ 8, ПК:1164, София, България
e-mail: n_stefanova@biofac.uni-sofia.bg*

EVALUATION OF THE PROLIFERATIVE PROPERTIES OF FIBROBLASTS IN THE SIMULATED MICROGRAVITY CONDITIONS

N. Stefanova, R. Skrobanska, B. Arabadzhiev

*Department of Cytology, histology and embryology; Faculty of biology; Sofia university “St.Kliment Ohridski”; Dragan Tzankov str. 8; 1164 Sofia; Bulgaria
e-mail: n_stefanova@biofac.uni-sofia.bg*

ABSTRACT

Ground based cell culture experiments in conditions of simulated microgravity, are an eligible alternative for examination of the cellular behavior and interactions in weightlessness, typical to the outer space. Such experiments may throw light on certain fundamental scientific problems, concerning the influence of the weak mechanical forces over the demeanour of the biological systems. In our present work, we will represent the results from the investigation of the fibroblasts growth characteristics, in conditions of simulated microgravity. The cells were cultivated 96 hours in a microgravity device (3D-clinostat) and subsequently the key proliferation markers – cyclin D and Erk1/2, were analyzed via Western Blot. Mouse fibroblasts of the GD25β1_A cell line were used for the purpose of current study.

Keywords: 3D fibroblast cultures, simulated microgravity

Използването на апарати за симулирана микрогравитация, работещи на принципа на разбъркване на посоката на вектора на гравитация (3Д-клиностати) е удобен и набиращ все по-голяма популярност подход за изследване поведението на биологични обекти в условия близки до безтегловност на Земята [1,2]. За сега все още твърде малко лаборатории в света притежават и работят с подобни апарати, пригодени за работа с клетъчни култури. Нуждата от такива изследвания обаче нараства все повече през последните години във връзка с развитието на космическите технологии, позволяващи по-продължителен престой на астронавтите в условия на микрогравитация на борда на Международната космическа станция, както и с бъдещите пилотирани мисии до Марс.

През 2012 г. съвместен екип от Биологически факултет на СУ „Свети Климент Охридски“ и „Институт за космически и изследвания и технологии“ при БАН конструира и изработи първия в България апарат за клетъчно култивиране в условия на симулирана микрогравитация – 3Д клиностат. Апаратът е предназначен за работа с животински клетъчни култури и може да бъде поставен в стандартен инкубатор за клетъчно култивиране. В настоящата работа са представени резултатите от пилотните тестове на апарата, целящи да установят въздействието на култивирането в условия на симулирана микрогравитация върху пролиферативната способност на миши фибробласти от линията GD25β1_A, както и върху способността на тези клетки да формират триизмерна клетъчна култура. Оценката на растежните характеристики на фибробластите беше направена чрез Western Blot анализ на ключовите маркери за пролиферация циклин D1 и pErk1/2.

Материали и методи

1. Клетъчно култивиране:

Използвана беше линията от миши ембрионални фибробласти: GD25 β 1_A, която е получена чрез стабилно трансфектиране на GD25 β 1^{-/-} фибробласти с гена за човешки β 1_A интегрин [3]. Клетките бяха култивирани при стандартни условия (37°C, 5% CO₂) в среда DMEM с високо съдържание на глюкоза + 10% FBS и 1 % (v/v) смес от антибиотици и антимиотици (penicillin 100 U /ml, streptomycin 100 μ g/ml и amphotericin B 0,25 μ g/ml) в петрита за клетъчно култивиране CellStar с d = 100 mm. За изготвянето на триизмерна култура клетките бяха посявани с начална концентрация 0.67 \times 10⁵ кл/см². Експериментите бяха извършвани на петия ден след посяването на клетките (четвъртия ден след достигане на 100% конфлуентен монослой).

2. *Клетъчно култивиране в условия на микрогравитация:* Използван беше апарат за симулирана микрогравитация – 3Д клиностаг, конструиран по проект № ДМУ 03/108 към фонд „Научни изследвания“ на MOMH. Апаратът функционира на принципа на разбъркване на посоката на вектора на гравитация посредством ротация по две взаимно перпендикулярни оси [4,5], при което средната големина на допълнителното ускорение се запазва под 10⁻¹g. Клиностагът беше поместен в стандартен инкубатор за клетъчно култивиране с вътрешни размери 60x60x60 см. За клетъчно култивиране в условия на микрогравитация бяха използвани камери OptiCell1100. Те могат да бъдат запечатани плътно, непозволявайки изтичането на средата и замърсяването на пробата при въртенето. Едновременно с това те осигуряват възможност за газообмен между средата за култивиране и газовата смес в инкубатора благодарение на газ-пропускливите си мембрани.

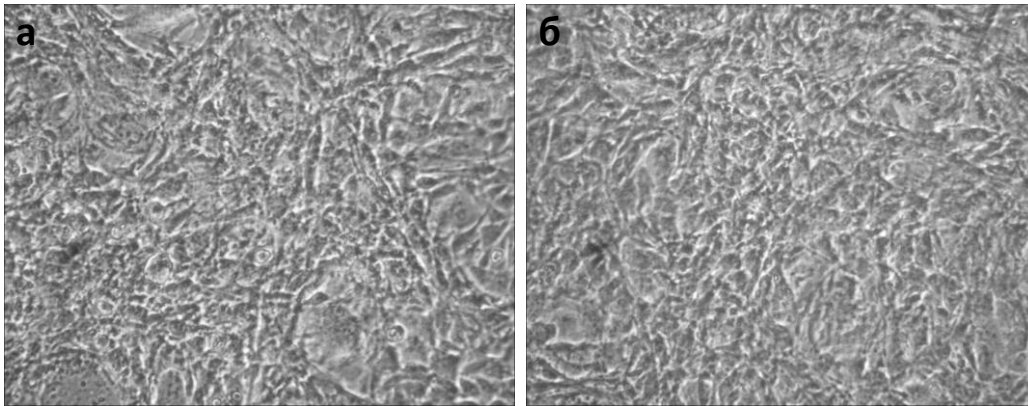
3. *Приготвяне на тотални клетъчни лизати:* Тоталните клетъчни лизати бяха приготвяни в равен обем RIPA буфер (150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton x 100, 10% Glycerol, 50 mM HEPES, pH 7,5) и 4 \times Simple буфер (0.25M Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 30% Glycerol, 0.02% Bromophenol Blue), заедно с протеазни инхибитори (Boehringer Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets), 1 mM NaF, 1 mM NaVO₄.

4. *PAA-гел електрофореза и Western Blot анализ:* За разделяне на белтъците бяха използвани 4% концентриращ полиакриламиден гел (4% PAA, 1% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8) и 8% разделящ полиакриламиден гел (8% PAA, 1% SDS, 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8). Електрофорезата беше провеждана при 80V за 1 час в 5 \times Running буфер (100 mM Tris, 960 mM glycine, 0.5% SDS). След електрофорезата гелът беше инкубиран в Blotting буфер (25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% methanol). Трансферът върху нитроцелулоза беше провеждан при 110V за 60-70 мин в Blotting буфер. След инкубирането с първо и второ анти тяло, получените бандове бяха проявени с ECL (Enhanced chemiluminescence) реагент и бяха експонирани върху рентгенови плаки. За денситометричен анализ на бандовете беше използван Scion Image софтуер, а статистическият анализ беше направен с програмата GraphPadInStat.

Резултати и обсъждане

1. *Формиране на триизмерна клетъчна култура в условия на симулирана микрогравитация.*

Способността на клетъчната линия GD25 β 1_A да формира триизмерна култура в условия на симулирана микрогравитация беше анализирана чрез паралелно култивиране в условия на нормална гравитация (1g) и симулирана микрогравитация. Установено беше, че при посяване с начална концентрация 0.67 \times 10⁵ кл/см², както при нормална гравитация, така в условия на микрогравитация, клетките формират 100 % конфлуентен монослой на 24 час след посяването. След 24 час, както в пробите при 1g, така и в тези, поставени в 3Д-клиностагата, се наблюдаваше многослоен растеж и на 5 ден след посяването (4 ден след достигане на 100 % конфлуентност) се наблюдаваше добре структурирана триизмерна култура (фиг. 1).



Фигура 1. 3D-култури, формирани от фибробласти от линията GD25β1_A.

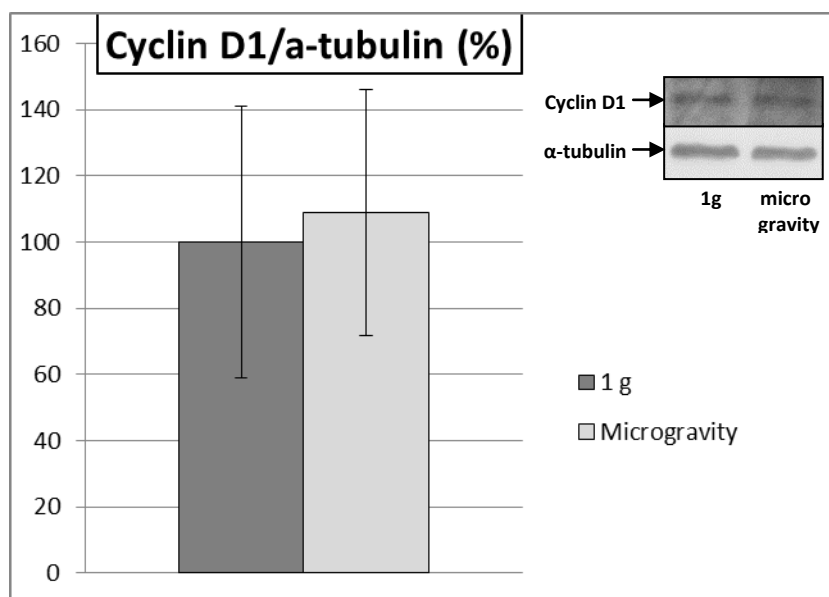
- а.** Контрола – петри CellStar, с обем 10 ml, което не е херметически запечатано и стои неподвижно.
б. Камера OptiCell 1100, в условия на симулирана микрогравитация (култивиране в 3Д-клиностаг).

2.Изследване на количествата циклин D1 и pErk1/2 в условия на симулирана микрогравитация.

Оценката на растежните характеристики на фибробластите в условия на симулирана микрогравитация беше направена чрез Western Blot анализ на ключовите маркери за пролиферация циклин D1 и pErk1/2. Използвани бяха 3D-култури от фибробласти от линията GD25β1_A на 5 ден след формиране на 100% конфлуентен монослой. За контрола бяха използвани аналогични 3D-култури, отглеждани при нормални условия (1g). Количеството на изследваните белтъци беше изчислено спрямо вътрешна контрола α-тубулин и бяха представени като съотношение изследван белтък/ α-тубулин. Стойностите, отчетени в пробата, култивирана в условия на микрогравитация, са представени като процент от съответните стойности, измерени в контролата. Резултатите бяха обработени статистически с програмата GraphPadInStat и бяха оформени в графики с Microsoft Excell.

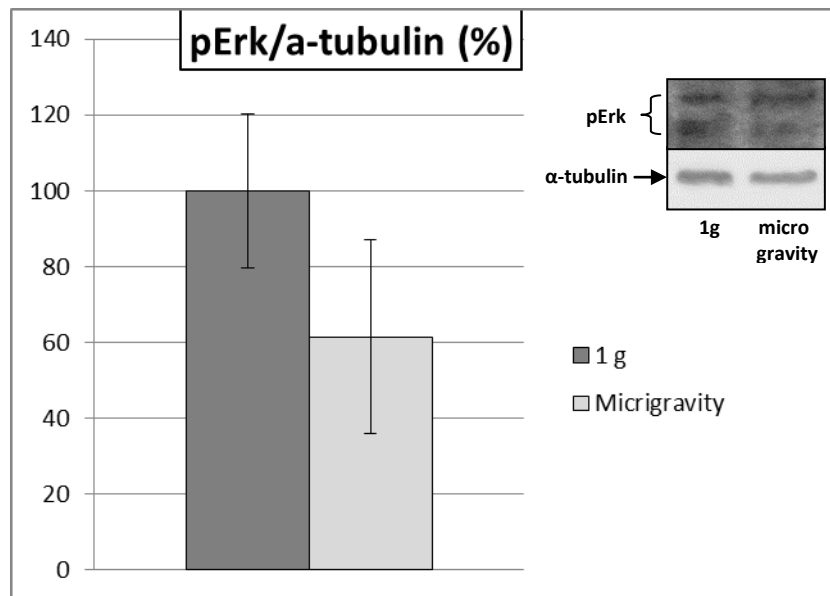
Резултатите показаха, че няма статистически значима разлика в експресията на циклин D1, както и количеството на фосфорилиран pErk1/2 между 3D-културите, отглеждани в условия на симулирана микрогравитация и тези, култивирани при нормални условия (1g) - (съответно $p=0,75$ за циклин D1 и $p=0,057$ за pErk1/2) (фиг. 2 и 3).

$p=0,75$



Фигура 2. Western Blot анализ на експресията на циклин D1 в 3D-културите, отглеждани в условия на симулирана микрогравитация.

p=0,057



Фигура 3. Western Blot анализ на фосфорилиран фосфорилиран Erk1/2 3D-културите, отглеждани в условия на симулирана микрогравитация.

Тези резултати показват, че култивирането в условия на симулирана микрогравитация с помощта на конструирания от нас 3Д-клиностаг не подтиска растежа на фибробластите и не пречи на формирането на триизмерни тъканно-подобни култури. Това е добра предпоставка за планираните бъдещите изследвания, касаещи характеристиките на клетка-матрикс адхезиите в 3Д-култури от фибробласти в условия на микрогравитация.

Авторите изказват благодарности към фонд „Научни изследвания“ на МОМН – проект № ДМУ 03/108

Цитирана литература:

1. Van Loon, J.J. W. A., The Gravity Environment in Space Experiments, *Biology in Space and Life on Earth. Effects of Spaceflight on Biological Systems*. Edited by Enno Brinckmann Copyright © 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGAA, Weinheim, ISBN: 978-3-527-40668-5
2. Borst, A. G., Jack J.W. A. van Loon, *Technology and Developments for the Random Positioning Machine, RPM, Microgravity Sci. Technol* (2009) 21:287–292
3. Pankov, R., Cukierman, E., Clark, K., Matsumoto, K., Hahn, C., LaFlamme, S. E., Poulin, B., and Yamada, K. M, 2003. Specific $\beta 1$ integrin site selectively regulates Akt/PKB signaling via local activation of PP2A. *J. Biol. Chem.* 278: 18671-18681.
4. Dedolph R. R., M. H. Dipert, *The Physical Basis of Gravity Stimulus Nullification by Clinostat Rotation, Plant Physiol.* (1971) 47, 756-764
5. Huijser R.H., *Desktop RPM: New Small Size Microgravity Simulator For The Bioscience Laboratory, FS-MG-R00-017 © Fokker Space (August 2000), <http://www.desc.med.vu.nl>*