

10. Лищук В.А. Математическая теория кровообращения // М.: Медицина. - 1991. - 256 с.
11. Аринчин Н.И., Петров С.В., Сенько В.В. О некоторых причинно-следственных отношениях при формировании типов саморегуляции кровообращения // Весці Акадэміі Навук Беларусі. Сер. 61 - ял. навук. - 1996. - № 2. - С. 95-99.

МАГНИТНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

¹Петрова Е.А., ¹Терпинская Т.И., ²Жолудь А.М., ²Кашевский Б.Э.

¹*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск,*

²*Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси,
Минск*

Введение. Исследование связи функциональных свойств клетки с ее морфологическими, химическими и физическими параметрами является основой для разработки новых методов клеточной биологии. В частности, характеристиками клетки, которые на сегодняшний день мало изучены, являются ее магнитные характеристики. Клетки, как и другие частицы, обладают магнитной восприимчивостью, обусловленной химическим составом и молекулярным состоянием образующих их соединений и внутриклеточных структур. На примере эритроцитов показано, что патологические изменения этих клеток, происходящие при заражении малярийным плазмодием, вызывают изменения их магнитных свойств, обусловленные состоянием гемоглобина [2]. Нами ранее показано, что одним из признаков наличия опухоли в организме экспериментального животного является изменение магнитной характеристики ядросодержащих клеток селезенки [3].

Цель: изучение магнитных свойств культивируемых клеток и исследование связи магнитных характеристик клеточной популяции со степенью митотической активности.

Методы исследования. Использовали клетки линии А549 (рак легкого человека) и иммортальные фибробласты человека (ИФ), полученные в Институте цитологии и генетики НАН Беларуси. Клетки пассировали и снимали для экспериментов на 1-й, 3-й (логарифмическая фаза) и 7-й день (стационарная фаза) [4]. К 6-7-му дню культуры достигали 100% конфлюэнтности.

Для количественной характеристики магнитных свойств клеток определяли их магнитофоретическую подвижность (МП) и относительную магнитную восприимчивость (ОМВ) по методу, описанному в [1]. Клетки из этих же проб фиксировали 80% этанолом и хранили при -20°C . Количество ДНК определяли с использованием красителя DAPI на проточном цитофлуориметре FACS Canto II. Распределение клеток по фазам клеточного цикла (G0 и G1; S; G2 и M) анализировали с помощью программы ModFitLT и рассчитывали соотношение клеток, находящихся в фазах G0 и G1, к клеткам, находящимся в фазах G2 и M клеточного цикла (соотношение G1/G2).

Результаты и их обсуждение. Исследуемые культуры различались по скорости роста. Клетки линии A549 быстро пролиферировали уже в первые сутки после пересева (лог-фаза), а культуры ИФ в первый день находились в лаг-фазе. При культивировании клеток пролиферативная активность снижалась по мере увеличения плотности слоя (рис. 1).

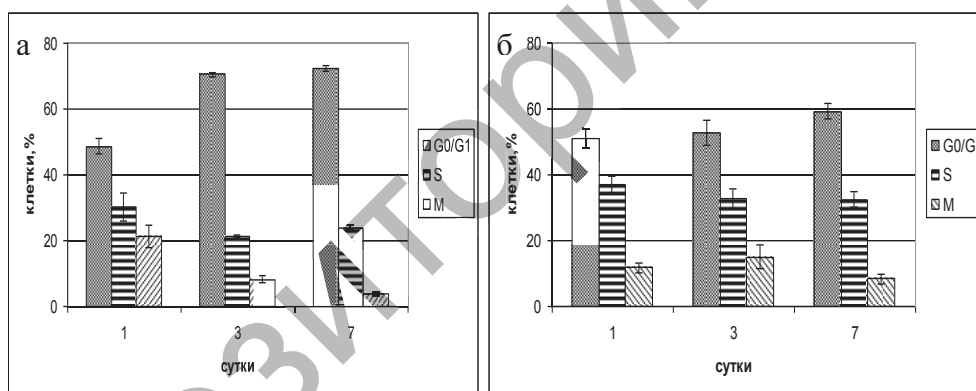


Рисунок 1 – Распределение клеток линии A549 (а) и ИФ (б) по фазам клеточного цикла при культивировании ($M \pm SD$)

Так, с 1 по 7 сутки возрастало количество клеток A549 в фазах G0 и G1 с $48,7 \pm 2,4\%$ до $72,2 \pm 0,8\%$, падала активность синтеза ДНК в клетках ($30,0 \pm 4,3$ и $24,0 \pm 0,6\%$, соответственно), и более чем в 5 раз снижалось количество клеток в фазах G2 и M (с $21,4 \pm 3,4\%$ до $3,8 \pm 0,4\%$), во всех случаях – $p < 0,05$. Аналогичная закономерность в изменении соотношения клеток с различным содержанием ДНК выявлена и для линии ИФ (рис. 1б). На 7-е сутки достоверно возрастало до $59 \pm 2,5\%$ содержание клеток в фазах G0 (покоящихся) и G1 по сравнению с 1-ми и 3-ми сутками

($51,0 \pm 3,7$ и $53 \pm 3,0\%$, соответственно). Число клеток в G2 и M фазах составляло $11,9 \pm 1,5\%$ на 1-е сутки и снижалось к 7-м суткам до $8,3 \pm 1,5\%$ ($p < 0,05$). При этом содержание клеток, находящихся в синтетической фазе, существенно не изменялось. Увеличение соотношения G1/G2, характеризующего пролиферативную активность культур, свидетельствовало о снижении интенсивности клеточного деления (рис. 2).

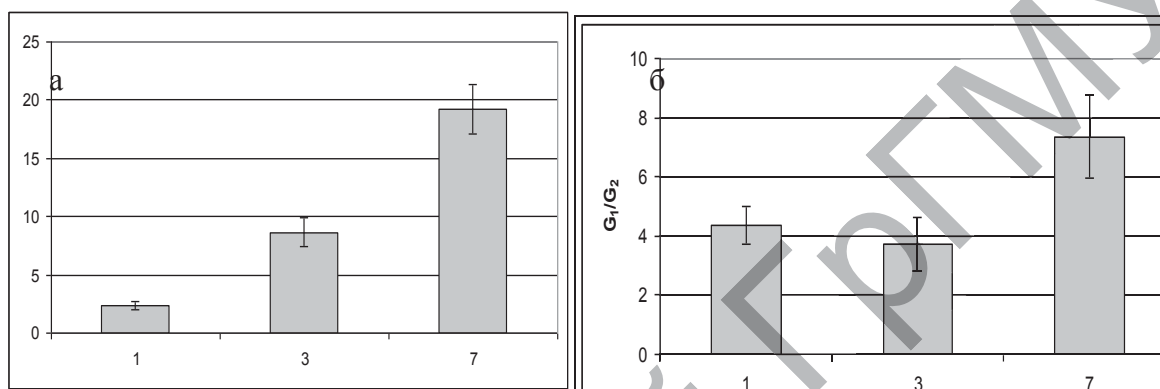


Рисунок 2 – Соотношение G1/G2 A549 (а) и ИФ (б) на 1-е, 3-и и 7-е сутки роста

Для линии A549 зависимость пролиферативной активности от стадии культивирования была ярко выражена и проявлялась уже к 3-м суткам после пересева, в то время как в культуре ИФ торможение пролиферации наблюдалось к 7-м суткам и было выражено в меньшей степени. По мере роста культур магнитные характеристики клеточной популяции сдвигались в область положительных значений (рис. 3).

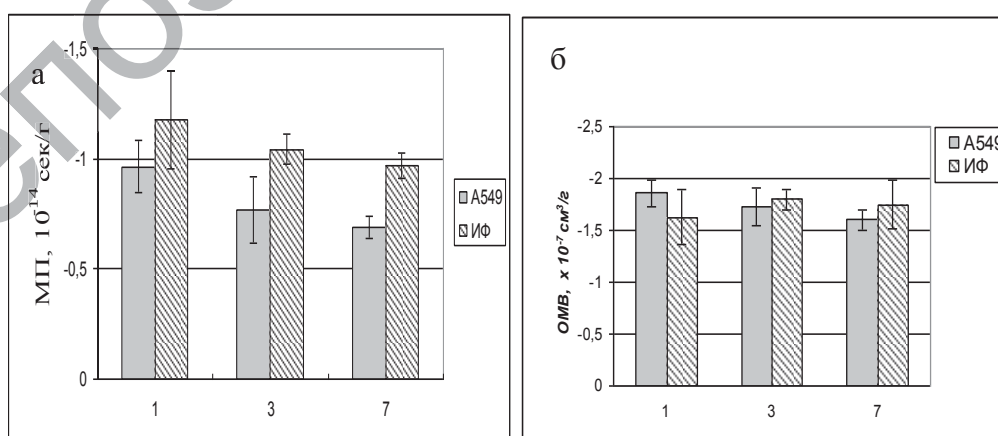


Рисунок 3 – Магнитофоретическая подвижность (а) и относительная магнитная восприимчивость клеток (б) клеток линии A549 и ИФ на 1-е, 3-и и 7-е сутки роста ($p < 0,05$)

МП в обоих случаях возрастала от 1 к 7-му дню культивирования (рис. 3а). Так, МП клеток А549 составляла - $0,96 \pm 0,12$ на 1-й день, $-0,76 \pm 0,14$ и $-0,69 \pm 0,05 \times 10^{-14}$ сек/г на 3-й и 7-й день, соответственно, т.е. клетки становились более парамагнитными. МП культур ИФ изменялась от $-1,18 \pm 0,22$ на 1-е сутки, до $-1,04 \pm 0,07$ к 3-м и $-0,97 \pm 0,06 \times 10^{-14}$ сек/г к 7-м суткам.

ОМВ в первый день роста культуры А549 составила - $1,86 \pm 0,12$, на 3-й - $1,73 \pm 0,18$, а на 7-й день роста $-1,6 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ см³/г (рис. 3а). ОМВ культур ИФ на 1-е сутки составляла - $1,63 \pm 0,26$, на 3-е сутки - $1,8 \pm 0,1$, а на 7-е сутки $-1,75 \pm 0,29 \times 10^{-7}$ см³/г (рис. 3б). Выявлена зависимость магнитных свойств клеток А549 от фазы клеточного цикла. Сильная коррелятивная связь обнаружена между соотношением G1/G2 с ОМВ, а также с МП (коэффициенты корреляции по Спирмену $R=0,68$ ($p<0,05$) и $R=0,79$ ($p<0,01$), соответственно). Для культуры ИФ также выявлена тенденция к изменению магнитных характеристик в сторону более парамагнитных значений при снижении пролиферативной активности. Однако для этих клеток изменения в соотношении G1/G2 и изменения магнитных свойств по мере роста были выражены слабее, чем для А549.

Выводы. Снижение в ходе культивирования пролиферативной активности клеток сопровождается изменением их магнитных свойств. Клетки становятся более парамагнитными: возрастает их магнитофоретическая подвижность и относительная магнитная восприимчивость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kashevsky B.E., Zholud A.M., Kashevsky S.B. Magnetophoretic trajectory tracking magnetometry: A new technique for assessing magnetic properties of submagnetic microparticles and cells // Rev. Sci. Instruments. – 2012. – Vol. 83. – Art. No 075104 [10 pages].
2. Moore L.R., Fujioka H., Williams P.S., Chalmers J.J., Grimberg B., Zimmerman P.A., Zborowski M. Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis // FASEB J. – 2006. – Vol. 20, № 6. – P. 747-749.
3. Терпинская Т.И., Жолудь А.М. Магнитофоретический анализ клеток селезенки и костного мозга при росте экспериментальной опухоли у мышей // Материалы Международной научной конференции "Фундаментальные науки - медицине", г. Минск, 17 мая 2013 г. – С. 303-307.
4. Культура животных клеток. Методы / Под. Ред. Р. Фрешни. – Москва: Мир, 1989. – С.62.