

DOI: 10.26693/jmbs02.04.185

УДК 57.085.23

Максименко О. С., Шкуропат А. В., Гасюк О. М.

БІОЛОГІЧНА ДІЯ ЕРИТРОПОЕТИНУ У РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ НА КУЛЬТУРУ КЛІТИН

Херсонський державний університет

maksimenko-lena12@rambler.ru

У статті описано біологічну дію різних концентрацій еритропоетину на тривалість окремих стадій розвитку культури клітин. На основі отриманих показників побудували криву росту культури клітин ендотеліосаркоми при інкубації з еритропоетином у різних концентраціях. З'ясували, що еритропоетин у всіх концентраціях сприяв швидшій адаптації клітин до нового середовища, проте не стимулював їх поділ.

Ключова слова: культура клітин, еритропоетин, крива росту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках науково-дослідної теми кафедри біології людини та імунології Херсонського державного університету «Дія гетероциклічних сполук на систему імунітету та морфологію внутрішніх органів лабораторних мишей», № держ. реєстрації 0111U007783.

Вступ. Культивування клітин в умовах *in vitro* з кожним роком все більше застосовується у найрізноманітніших галузях біології, сільського господарства та медицини. В останні роки культивування клітин *in vitro* набуло широкого поширення у швидко прогресуючих прикладних галузях біотехнології. Культуру тваринних тканин застосовують для вивчення механізмів гістогенезу, міжтканинних і міжклітинних контактів, метаболітичних процесів. Також цей метод використовують при вирішенні таких загально біологічних проблем, як з'ясування механізмів диференціювання і проліферації різних видів клітин [1].

Найбільш важливою характеристикою культури є її ріст, а саме дослідження кількості клітин на різних стадіях існування культури. Відповідно розробляються нові та удосконалюються вже відомі методи дослідження параметрів росту клітин [2]. Також актуальним є дослідження впливу біологічно активних речовин, зокрема еритропоетину, на ростові параметри культури клітин, що дозволяє визначати біологічну дію цих речовин в залежності від їх концентрації, та оцінити процеси життєдіяльності, які відбуваються у клітинах [3].

Еритропоетин – це гормон, який, за даними ряду досліджень, має плейотропний вплив на фізіологічні системи організму людини. Показано, що рецептори до еритропоетину є не лише на мембранах клітин червоного кісткового мозку, їх також виявлено в клітинах ендотелію, гладеньких і скелетних м'язів, міокарді [5].

Мета даного дослідження – виявити залежність тривалості окремих стадій розвитку культури клітин ендотеліосаркоми миші від концентрації еритропоетину.

Об'єкт і методи дослідження. Культуру клітин ендотеліосаркоми миші отримували шляхом експлантації окремих частин пухлини та стандартних процедур культивування. Для з'ясування впливу еритропоетину на кінетику параметрів росту культури клітин було сформовано чотири досліджувані групи: перша інкубувалася з еритропоетином у концентрації 13 МЕ/мл, друга – 6,5 МЕ/мл, третя – 0,13 МЕ/мл і четверта – контрольна група. Інкубація тривала протягом 32 днів. Періодично робився підрахунок кількості клітин у камері Горяєва. На основі отриманих даних будувалася крива росту з подальшим аналізом її окремих ланок [4].

Результати досліджень та їх обговорення. Аналізуючи кінетику параметрів росту культури клітин усіх чотирьох досліджуваних груп ми виявили, що ріст культури клітин характеризувався наявністю чотирьох фаз: лаг-фази, фази експоненційного росту, стаціонарної фази та деградації культури (рис.).

Тривалість лаг-фази при інкубації з еритропоетином у концентрації 13 МЕ/мл була 8 діб, причому на 4 добу спостерігалася зменшення кількості клітин. Експоненційна фаза тривала протягом 12 діб, концентрація клітин збільшилася трохи більше, ніж у 100 разів. Починаючи з 21-ї доби кількість клітин починає зменшуватися. Стаціонарна фаза не виявляється, а культура відразу переходить у фазу деградації.

Під час інкубації культури клітин з еритропоетином у концентрації 6,5 МЕ/мл лаг-фаза тривала також 8 діб, проте не спостерігалася падіння

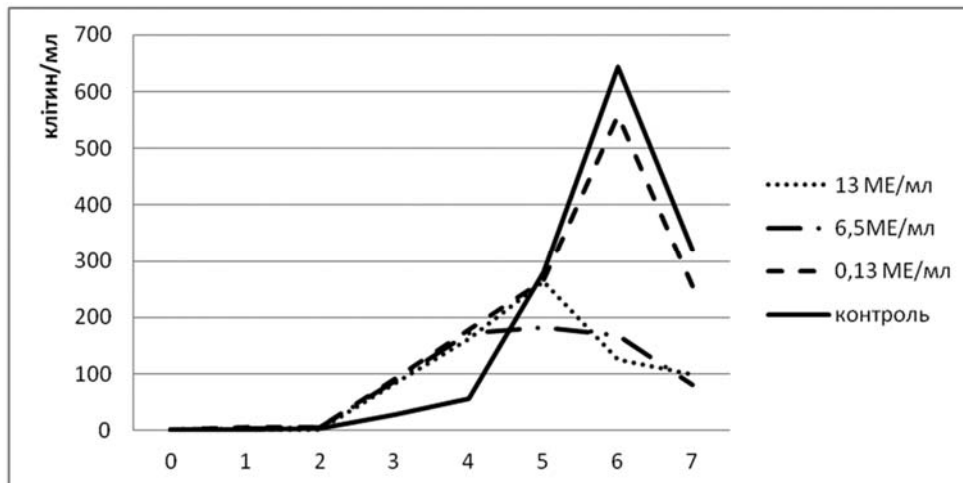


Рис. Крива росту культури клітин ендотеліосаркоми при інкубації з еритропоетином у різних концентраціях

концентрації клітин протягом цієї фази. Експоненційна фаза тривала також 8 діб, концентрація клітин збільшилася у 70 разів. З 17-ї по 24-ту добу триває стаціонарна фаза росту культури, починаючи з 25-ї доби культура клітин входить у фазу деградації.

Культура клітин, що інкубувалася з еритропоетином у концентрації 0,13 МЕ/мл, мала такі тривалості фаз росту: лаг-фаза тривала приблизно 8 діб, експоненційна фаза тривала 20 діб, причому концентрація клітин збільшилася практично у 250 разів порівняно з посівною концентрацією, стаціонарна фаза не виражена, починаючи з 29 доби відбувається деградація культури клітин.

Лаг-фаза контрольної культури клітин тривала майже 20 діб, при цьому перші 8 діб зростання кількості клітин було майже не помітним, а з 9-ї доби інтенсивність росту культури збільшилася. Починаючи з 21 доби спостерігається фаза експоненційного росту, що триває приблизно 8 діб, концентрація клітин збільшується трохи більше, ніж у 250 разів. Починаючи з 28 доби культивування спостерігається деградація культури клітин. Стаціонарна фаза не виражена.

Відсутність стаціонарної фази під час інкубування з еритропоетином у концентрації 13 МЕ/мл, 0,13 МЕ/мл та контрольній групі може пояснюватися суттєвим збільшенням кількості клітин у експоненційній фазі (у більше, ніж 100, 200 та 250 разів відповідно) та виснаженням поживного середовища. У групі клітин, що культивувалися з еритропоетином у концентрації 6,5 МЕ/мл збільшення кількості клітин у експоненційній фазі було не таким інтенсивним (у 70 разів), це не призвело до швидкого виснаження поживного середовища та обумовило наявність стаціонарної фази.

Ми з'ясували, що еритропоетин як біологічно активна речовина має не однакову дію на культуру клітин у різних концентраціях. Так у високій концентрації (13 МЕ/мл) він мав помірну пригнічувальну дію на ріст культури клітин. Хоча він стимулював швидший перехід культури клітин з лаг-фази у фазу експоненційного росту порівняно з контрольною групою, проте максимальна концентрація клітин так і не досягла рівня контрольної групи. У середній концентрації (6,5 МЕ/мл) еритропоетин мав виражену пригнічувальну дію. Тривалість лаг-фази була меншою, ніж у контрольній, проте тривалість фази експоненційного росту була такою ж, як і у контрольній групі. Максимальна концентрація клітин була у 3,8 разів меншою за контрольну. У низькій концентрації (0,13 МЕ/мл) еритропоетин практично не виявляв пригнічувальної дії. Він сприяв швидшому переходу культури клітин у експоненційний ріст, порівняно з контрольною групою, а максимальна концентрація клітин майже досягла такого рівня, як і у контрольній групі.

Отже, еритропоетин у всіх концентраціях сприяв швидшій адаптації клітин до нового середовища (зменшення тривалості лаг-фази), проте не стимулював поділ клітин (збільшення концентрації клітин), а у середній та високій концентрації пригнічував його, причому під час інкубування з еритропоетином у середніх концентраціях пригнічувальна дія на поділ клітин була більш вираженою, порівняно з іншими концентраціями.

Висновки.

1. Виясовано, що у високій концентрації (13 МЕ/мл) еритропоетин мав помірну пригнічувальну дію на ріст культури клітин.
2. Виявлено, що у середній концентрації (6,5 МЕ/мл) еритропоетин мав виражену пригнічувальну дію.

3. Встановлено, що у низькій концентрації (0,13 МЕ/мл) еритропоетин практично не виявляв пригнічувальної дії.
4. З'ясовано, що еритропоетин у всіх концентраціях сприяв швидшій адаптації клітин до нового середовища (зменшення тривалості лаг-фази), проте не стимулював поділ клітин (збільшення концентрації клітин).

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується оцінити біологічну дію еритропоетину на культуру клітин у інших концентраціях та провести оцінку життєздатності клітин при інкубації з цими концентраціями.

References

1. Vechkanov EM, Sorokina IA. *Kletochnaya inzheneriya*. Rostov-na-Donu: YuFU, 2012. 134s. [Russian].
2. Karen Kirkwood. *CELL CULTURE BASICS*. USA: Invitrogen Gibso, 2014. 62 p.
3. Garmanchuk LV. *Metodichni rekomendatsiyi do spetspraktikumu «Kultura klitin ta klonuvannya»* u 2 chastinakh. Ch II. Kiyiv, 2013 40s. [Ukrainian].
4. Freshni RYa. *Kultura zhivotnykh kletok*. Prakticheskoe rukovodstvo. Moskva: BINOM Laboratoriya znaniy, 2010. 714 s. [Russian].
5. Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Reme C. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med*. 2002 Jun; 8: 718-24. PMID: 12068288. DOI: 10.1038/nm723.

УДК 57.085.23

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА В РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Максименко А. С., Шкуропат А. В., Гасюк О. М.

Резюме. В статье описано биологическое действие различных концентраций эритропоэтина на продолжительность отдельных стадий развития культуры клеток. На основе полученных показателей построили кривую роста культуры клеток эндотелиосаркомы при инкубации с эритропоэтином в различных концентрациях. Выяснили, что эритропоэтин во всех концентрациях способствовал быстрой адаптации клеток к новой среде, однако не стимулировал их разделение.

Ключевые слова: культура клеток, эритропоэтин, кривая роста.

UDC 57.085.23

Biological Effect of Erythropoietine in Different Concentrations on the Cell Culture

Maksymenko O., Shkuropat A., Hasiuk O.

Abstract. Nowadays cells cultivation in vitro becomes more and more widespread in various fields of biology, agriculture and medicine. The most essential characteristic of culture is growth, namely the study of the number of cells on the different life's stages. Accordingly, a lot of new methods of cell's growth parameters research tend to continually develop and improve. In addition, the study of the biologically active substances influence, such as erythropoietin, on the growth parameters of the cell culture is quite popular today. It allows to determine the biological effect of these substances, depending on their concentration, and to assess the life processes that occur in cells.

Erythropoietin is a hormone, which, according to several researches, has a pleiotropic effect on physiological systems of the human body. It is shown that the erythropoietin receptors were also detected in endothelial cells, smooth and skeletal muscle, the myocardium.

The purpose of the study was to determine the dependence of the individual stages duration on the development of cell culture endothelioma of the mouse from erythropoietin concentration.

The cell culture of the mouse endothelium was obtained by explants separate parts of the tumor and standard cultivation procedures. To determine the effect of erythropoietin on the kinetics parameters of culture cells growth was formed four research groups: the first was incubated with erythropoietin at a concentration of 13 IU/ml, the second was 6.5 IU/ml, a third was 0.13 IU/ml and the fourth was a control group. The incubation lasted 32 days. Periodically Goryaeva's camera was counting the number of cells in culture. On the basis of the obtained data the growth curve with subsequent analysis of its separate parts was observed.

During the research procedures it was found out that the growth of culture cells was characterized by four phases: the lag phase, phase of exponential growth, stationary phase, and the degradation of culture.

It was also found out that erythropoietin as a biologically active substance has not the same effect on the cell culture in varying concentrations. If the concentration is high (13 IU/ml), it has a moderate dampening effect

on the growth of culture cells. Although it stimulated a rapid transfer of culture cells from the lag phase to the exponential phase compared to the control group, however, the maximum cell concentration has never reached the level of the control group. At an average concentration of (6,5 IU/ml) erythropoietin had a pronounced dampening effect. The duration of the lag phase was less than in the control group, but the duration of the exponential growth phase was the same as in the control group. The maximum concentration of cells was 3.8 times less than the control. At low concentrations (0,13 IU/ml) erythropoietin almost had not inhibitory action. It contributed to a more rapid transition of the cell cultures in exponential growth, compared to the control group, and the maximum concentration of cells reached almost the same level as in the control group.

To sum up, in the all concentrations erythropoietin contributed to a more rapid cells' adaptation to new environment (reducing the duration of lag phase), but did not stimulate cell division (increase in cell concentration), medium and high concentrations suppress it. It should be also noted that during incubation with erythropoietin in average concentrations of inhibition effect on cell division was more pronounced, compared to other concentrations.

Keywords: cell culture, erythropoietin, growth curve.

Стаття надійшла 25.08.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування