

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный

педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный

педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, заведующая кафедрой,

старший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный

педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Сихарулидзе Сергей Владимирович

пластиический хирург

Многопрофильная больница «ВМ-клиник»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Савельева Виктория Алексеевна

лаборант-исследователь

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ФИБРОБЛАСТОВ/МЕЛАНОЦИТОВ

Аннотация: приведены данные по исследованию влияния обогащенной витаминным комплексом питательной среды на морфометрические показатели клеточной линии фибробластов/меланоцитов. Установлено, что культивирование клеточной линии в обогащенной среде приводит к синхронности уровня напряженности синтетических процессов, которые проявляются в сопряженности с числом, морфологией ядрышек и ядер в обогащенной витаминным комплексом среде.

Ключевые слова: витаминный комплекс, сокультура, фибробласты, меланоциты, ядрышко, ядро.

Культура клеток является модельной системой для изучения влияния различных компонентов среды культивирования, таких как аминокислоты, витамины, как в качестве монокомпонентов, так и в виде питательных кластеров, на функциональную активность, пролиферацию, гибель клеток, профиль синтеза белков внутриклеточного матрикса (ВКМ) и др. [1–3, 8–10] с целью оптимизации состава питательной среды для культивирования.

В связи с этим целью нашей работы являлось изучение морфометрических показателей ядер и ядрышек клеточной линии фибробластов/меланоцитов, которые отражают морфофункциональные изменения в условиях культивирования на обогащенной витаминным комплексом среде.

Материалы и методы. Для получения первичной культуры использовали экспланты кожного лоскута размерами около $1,0 \times 5,0$ см, иссеченные из области груди (ареола) с информированного согласия пациента во время проведения пла-

нового хирургического вмешательства. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по этике многопрофильной больницы «ВМ-клиник» города Ульяновска (протокол №22 от 11.02.2024). Культивирование фибробластов/меланоцитов выполнялось в условиях лаборатории клеточных технологий НИЦ ФППБ УлГПУ им. И.Н. Ульянова. Для получения первичных культур использовали метод механической дезагрегации (метод эксплантов), описанный ранее [4]. Протокол культивирования, использованные реагенты и состав комплекса витаминов описаны подробно ранее [5]. Для работы использованы клеточные линии пятого пассажа.

Сформированы 2 группы клеточных линий фибробластов/меланоцитов: *Cul* – стандартная среда без добавления витаминного комплекса (контроль) и *CulVx5* – стандартная среда с добавлением витаминной кластерной добавки.

Оценку роста и морфологии клеток, а также фотофиксацию проводили на флуоресцентном инвертированном микроскопе «Axio Vert. A1 FL» с цифровой цветной видеокамерой Axiocam 105 (Carl Zeiss, Германия). Световую микроскопию цитотипов проводили путем окрашивания гематоксилином-эозином (ГЭ) клеточных линий на покровных стеклах, фиксированных в 10% формалине и заключенных в среду Immu-Mount. Оцифровка цитологических препаратов проводили с помощью цифрового сканирующего микроскопа Pannoramic Desk (3DHISTECH, Венгрия), с использованием технологии Whole slide imaging (WSI, полнослайдовые изображения). Морфометрические измерения и анализ изображений проводили с использованием программы Case Viewer. Измеряли периметр, площадь, количество и форму ядер на единицу площади ($100\ 000\mu\text{m}^2$) и количество ядрышек в 75 просмотренных ядрах.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2010 и статистического пакета Prism 8.0.1 (Graphpad, США). Проверка нормальности распределения данных проводилась критерием Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk normality test). Для каждой выборки было рассчитано среднее значение, стандартное отклонение, коэффициент вари-

абельности. Различия величин тестируемых показателей в контрольной и экспериментальной группе оценивали с помощью попарной статистики, используя *t*-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Ранее нами определены морфологические различия клеток группы *CulVx5* относительно контрольной группы *Cul* [5]. В ходе данного исследования морфологический анализ выявил, что коэффициент вариации числа ядрышек в контрольной группе составлял 39%, а в группе *CulVx5* 30%, что указывает на синхронность уровня напряженности синтетических процессов в клетках в условиях культивирования с использованием обогащенной витаминным комплексом среды. В группе *CulVx5* количество ядрышек составляет – 3–4, в сравнении с 2–3 в контроле (рис. 1). Отмеченная таким образом амплификация ядрышек является показателем более выраженной экспрессии генов мРНК и процессинга с формированием зрелых субъединиц рибосом. Кроме амплификации ядрышек, в ядрах клеток группы *CulVx5* отмечается более выраженный гранулярный компонент (рис. 2). Аналогичные результаты были получены при исследовании клеточной культуры фибробластов в условиях культивирования с обогащением питательной среды магнием, что свидетельствовало об активном воспроизведении в фибробластах аппарата для белкового синтеза [6].

Также нами отмечено, что в сравнении с контрольной группой (*Cul*) в группе *CulVx5* в 1,3 раза снижается количество ядер овальной формы, тогда как округлой формой наоборот более чем в три раза увеличивается (рис. 3).

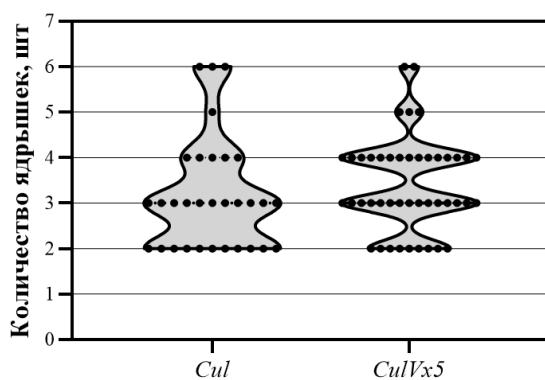


Рис. 1. Количество ядрышек в клетках контрольной группы (*Cul*) и в группе с добавлением витаминного комплекса (*CulVx5*).

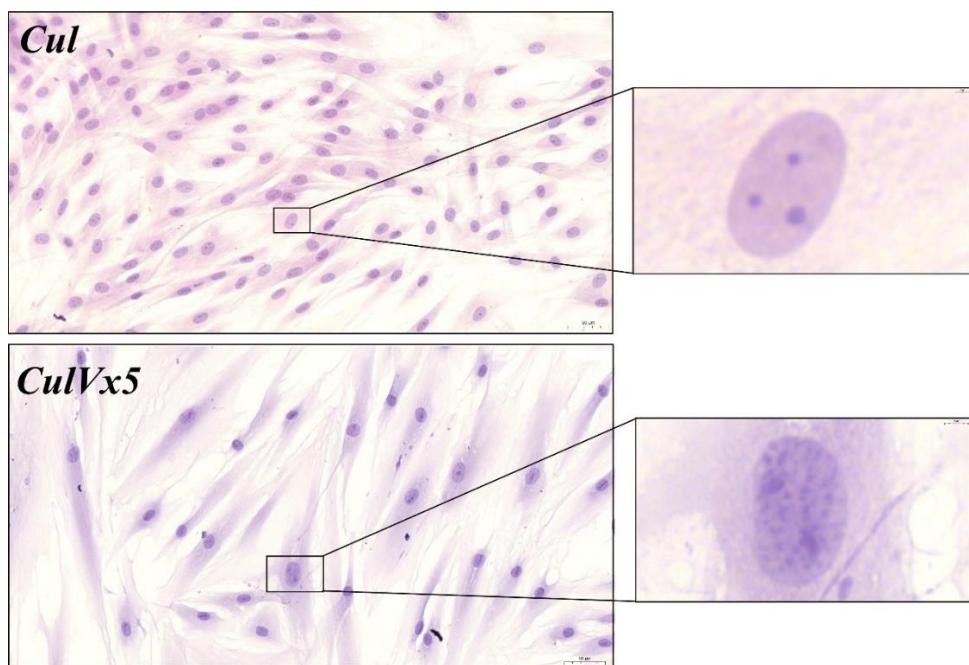


Рис. 2. Сокультура фибробластов/меланоцитов контрольной группы (*Cul*) и группы с добавлением комплекса витаминов (*CulVx5*).

Окраска гематоксилином и эозином

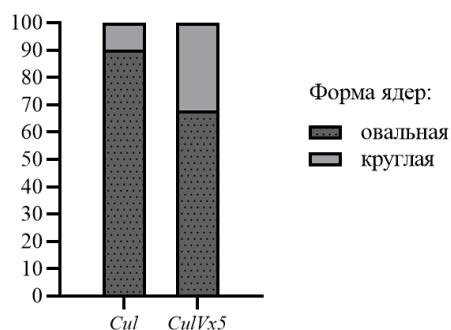


Рис. 3. Соотношение количества клеток разной формы в контрольной группе (*Cul*) и с добавлением комплекса витаминов (*CulVx5*)

Выявленные особенности ядерного аппарата находятся в соответствии с ранее полученными нами результатами о том, что показатель количества клеток на стадии полиплоидизации (S-стадия) в группе *CulVx5* (9,49%) более чем в 2 раза больше, чем в контрольной группе (4,4%) [7]. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения обогащенной витаминами среды для накопления клеток в синтетической фазе (S-стадии) клеточного цикла.

Таким образом, обогащение витаминным комплексом питательной среды приводит к активации синтетических процессов, что отражается в морфологических показателях ядерного аппарата.

Список литературы

1. Schnellbaecher A., Binder D., Bellmaine S., Zimmer A. Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies // Biotechnol Bioeng. 2019 Jun; 116 (6):1537–1555. doi: 10.1002/bit.26942. Epub 2019 Feb 21. EDN NQCFKY
2. Palmieri A., Avantaggiato A., Cura F., et al. Effect of biostimulation on oral fibroblast: a pilot study // J Biol Regul Homeost Agents. – 2017. – 31 (4). – P. 139–145.
3. Ishaque A., Al-Rubeai M. Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. Apoptosis. 2002 Jun; 7 (3): 231–9. doi: 10.1023/a:1015343616059. PMID: 11997667. EDN ERNVWP
4. Киямова М.Р. Оптимизация протоколов выделения и культивирования клеток различных топографических участков кожи человека / М.Р. Киямова, Е.И. Антонова, Н.В. Фирсова [и др.] // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии: сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Ульяновск, 20 мая 2022 года) / гл. ред. Е.И. Антонова. – Чебоксары: Среда, 2022. – С. 107–116. – DOI 10.31483/r-102248. – EDN AQNOJW.
5. Антонова Е.И. Повышение эффективности культивирования сокультуры дермальных фибробластов/меланоцитов за счет внесения кластера витаминных добавок (в аспекте разработки эквивалента кожи) / Е.И. Антонова, Н.В. Фирсова, Н.А. Ленгесова [и др.] // Тенденции развития науки и образования. – 2024. – №105–9. – С. 91–97. – DOI 10.18411/trnio-01-2024-446. – EDN XKXIIW
6. Диценко Л.В. Морффункциональная характеристика фибробластов клеточной культуры McCoу при культивировании с препаратами магния / Л.В. Диценко, Т.Г. Боровая, Е.А. Кост [и др.] // РФК. – 2015. – №2. – EDN TQTHUX
7. Антонова Е.И. Клеточный цикл как критерий оценки биосовместимости фибробластов и скаффолдов в системе *in vitro* после воздействия УФ-облучения

в аспекте создания эквивалента кожи / Е.И. Антонова, Н.В. Фирсова, М.Р. Киямова [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022. – №9 (123). DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.123.10>. EDN PWVYAC

8. Mahajan A.S., Arikatla V.S., Thyagarajan A., et al. Creatine and nicotinamide prevent oxidant-induced senescence in human fibroblasts // Nutrients. – 2021. – 13 (11). – P. 4102.

9. Jagoda S.V., Dixon K.M. Protective effects of 1,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs on ultraviolet radiation-induced oxidative stress: a review. Redox Rep. 2020; 25 (1): 11–16. DOI 10.1080/13510002.2020.1731261. EDN BUOTYX

10. Han D., Liu Y., Li X., Zhang T., Li Z., Du S., Guo M. Effect of beta -alanine and the solvent composition on the solubility of solvate of calcium d-pantothenate containing four molecules of methanol and one molecule of water (D-PC·4MeOH·1H₂O) // The Journal of Chemical Thermodynamics. 106: 36–46.