

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА КЛОНАЛЬНЫЙ РОСТ И ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ

О.Н. Хныкова, О.В. Паюшина, Н.Н. Буторина, Э.И. Буеверова, В.И. Старостин

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, payushina@mail.ru

Белки внеклеточного матрикса являются необходимым компонентом микроокружения мезенхимных стромальных клеток (МСК). Исследование адгезивных взаимодействий МСК с матриксом необходимо для понимания механизмов регуляции пролиферации и дифференцировки МСК и важно для дальнейшего развития клеточной терапии. Целью этого исследования был анализ влияния некоторых белков внеклеточного матрикса (коллаген I типа, фибронектин и ламинин) на клональный рост и остеогенные потенции МСК, полученных из костного мозга половозрелых крыс и печени зародышей крыс. Было обнаружено, что для обоих источников доля колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф), прикрепившихся за первые 7 дней инкубации, существенно выше на фибронектиновом и коллагеновом покрытии по сравнению с обычным пластиковым покрытием. Влияние ламинина на адгезию КОЕ-Ф выражено в меньшей степени. Анализ экспрессии щелочной фосфатазы, маркирующей ранние стадии остеогенной дифференцировки, указывает на сниженный остеогенный потенциал костномозговых КОЕ-Ф на фибронектине по сравнению с пластиком, коллагеном I типа и ламинином. Доля остеогенных клеток среди КОЕ-Ф зародышевой печени крайне низка независимо от присутствия белков внеклеточного матрикса. Анализ терминальной дифференцировки костномозговых МСК в остеогенной среде показал подавляющий эффект фибронектина на отложение кальция в остеогенных узелках. Коллаген I типа и ламинин существенного эффекта на остеогенную дифференцировку в данной экспериментальной системе не оказывали. Изучение молекулярных механизмов обнаруженных явлений представляется перспективной темой для дальнейших исследований.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, колониеобразующие единицы фибробластов, остеогенез, адгезия, белки внеклеточного матрикса, коллаген I типа, ламинин, фибронектин.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК), впервые описанные Фриденштейном (1, 2) как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф), в настоящее время определяются как адгезивные к пластику клетки со специфическим поверхностным фенотипом (CD73⁺CD90⁺CD105⁺ при отсутствии кроветворных маркеров), способные к остео-, адипо- и хондрогенной дифференцировке *in vitro* (3). Клетки, удовлетворяющие критериям МСК, присутствуют в костном мозге, жировой ткани (4), стенке сосудов (5), надкостнице (6), пульпе зуба (7), пуповинной крови (8), синовиальной мембране (9) и некоторых фетальных органах – печени, сердце, поджелудочной железе, легком и селезенке (10). МСК из разных источников сходны по основным характеристикам, хотя могут иметь некоторые различия по потенциям к пролиферации и дифференцировке и по экспрессии некоторых маркеров. Например, показано, что при практически одинаковом иммунофенотипе МСК из фетальной селезенки имеют сниженные потенции к адипогенезу, а МСК из фетальной печени – к остеогенезу (10).

Возможность получения МСК из аутологических источников (например, костного мозга или жировой ткани), сравнительная легкость их культивирования и высокая способность к пролиферации и дифференцировке делают эти клетки перспективными для применения в регенеративной медицине. Большое значение для понимания механизмов регуляции роста и дифференцировки МСК, а также для совершенствования методов их клинического использования, имеет изучение их взаимодействий с микроокружением, одним из важных компонентов которого является внеклеточный матрикс. МСК продуцируют такие молекулы внеклеточного матрикса, как коллаген I и III типов, фибронектин, ламинин, остеоонектин и некоторые другие, и несут на своей поверхности рецепторы к этим белкам (11). Особое место среди этих рецепторов занимают интегрины - особый класс белков, состоящих из двух полипептидных цепей α и β . На мембране МСК присутствуют субъединицы интегринов $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha v, \beta 1, \beta 3, \beta 4$. Есть свидетельства того, что образование групп интегринов в местах контакта с матриксом может инициировать сборку сигнального комплекса на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны, подобно действию рецепторов факторов роста, и активировать некоторые сигнальные пути, в частности, инозитол-трифосфатный. Внутриклеточные сигналы, генерируемые при связывании белков внеклеточного

матрикса с интегринами, могут влиять как на митотическую активность клеток, так и на их потенции к дифференцировке в том или ином направлении.

К настоящему моменту данные о влиянии различных белков матрикса на МСК довольно противоречивы. Разные авторы по-разному оценивают адгезивные способности МСК по отношению к этим молекулам. Данные об изменении дифференцировочных потенций МСК при культивировании на разных субстратах также неоднозначны. Одним из наиболее изученных к настоящему времени белков внеклеточного матрикса является коллаген I типа. Известно, что МСК демонстрируют выраженную адгезивность к нему и высокую способность к пролиферации на коллагеновых носителях *in vitro* (12). При этом коллаген I типа способствует остеогенной дифференцировке МСК (13), что позволяет выращивать их на коллагеновых губках и применять для репарации костных и хрящевых дефектов (14), но делает коллагеновые носители непригодными для лечения повреждений сосудов и т.п.

В связи с вышесказанным, комплексное исследование влияния белков внеклеточного матрикса на адгезию, пролиферацию и дифференцировку МСК представляет значительный интерес как с теоретической точки зрения (для выяснения конкретных механизмов регуляторного воздействия микроокружения на функции клеток), так и с практической (для разработки оптимальных протоколов культивирования МСК и носителей для их трансплантации в разные области организма). В настоящей работе было проведено сравнительное исследование клонального роста и остеогенных потенций МСК костного мозга и зародышевой печени крысы при их культивировании на одних из основных компонентов внеклеточного матрикса - фибронектине, коллагене I типа и ламинине.

Материал и методы

Животные. В качестве источника клеток были использованы крысы Wistar неинбредного разведения (самки в возрасте 3–5 мес. и весом 220–330 г) и их плоды 16 сут развития. Первым днем эмбриогенеза считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке.

Реактивы и материалы. Для культивирования клеток использовали среду α -MEM, сыворотку плодов коровы, растворы L-глутамина, антибиотика-антимикотика, пенициллина-стрептомицина и 0,25 %-ный трипсин с ЭДТА фирмы HyClone (США), флаконы с площадью дна 25 см² и 12-луночные платы BD Bioscoat, покрытые коллагеном I типа или ламинином (BD Biosciences, США), либо аналогичные флаконы и платы без белкового покрытия (Greiner,

Германия). Фибронектин из плазмы крови человека был любезно предоставлен А.А. Мининым (Лаборатория биохимической эмбриологии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН); культуральную посуду покрывали им, нанося на дно раствор фибронектина с концентрацией 50 мкг/мл и высушивая в ламинарном боксе в течение 2 ч. В работе были использованы дексаметазон, β -глицерофосфат натрия, набор для выявления активности щелочной фосфатазы (ЩФ), ализариновый красный S, раствор гематоксилина Гилла фирмы Sigma (США) и 2-фосфо-L-аскорбат фирмы Fluka (Германия).

Выделение и культивирование клеток. Клеточную суспензию, полученную из костного мозга половозрелых крыс или печени плодов, помещали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в культуральные флаконы и инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂ в среде α -MEM с 10% сыворотки плодов коровы с добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина. В экспериментах по оценке числа КОЕ-Ф, прикрепляющихся к субстрату в разные сроки культивирования, клетки инкубировали в течение 7 сут во флаконах, покрытых белками внеклеточного матрикса, или в пластиковых флаконах без белкового покрытия, после чего проводили смену среды и продолжали культивировать клетки костного мозга в течение 4–5 сут, а клетки зародышевой печени – в течение 1 сут. Удаляемую при смене среду с неприкрепленными клетками переносили в новые флаконы с тем же покрытием и культивировали в течение 7 сут (костный мозг) или 5 сут (зародышевая печень). Для индукции остеогенной дифференцировки клетки костного мозга культивировали в непокрытых флаконах до слияния колоний, снимали трипсином с ЭДТА и пересеивали с концентрацией $1\text{--}5 \times 10^4$ клеток/мл в платы с индукционной средой (α -MEM с 10% сыворотки плодов коровы с добавлением 10^{-8} М дексаметазона, 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата и 10 мМ β -глицерофосфата натрия), покрытые изучаемыми белками. Культивирование продолжали в течение 14 сут, сменяя среду дважды в неделю.

Анализ результатов. Для подсчета колоний и анализа активности щелочной фосфатазы культуры фиксировали смесью цитрата, ацетона и формальдегида и проводили реакцию азосочетания прочного красно-фиолетового FRV с нафтолом AS-BI согласно протоколу фирмы-производителя. Численность КОЕ-Ф определяли подсчетом колоний, содержащих не менее 50 клеток. В экспериментах по индукции остеогенеза культуры фиксировали 96⁰-ным этанолом и выявляли отложения солей кальция путем окрашивания ализариновым красным S в течение 10 мин при pH 4.1 (15); ядра докрашивали гематоксилином. Величину минерализованных очагов остеогенеза оценивали, измеряя площадь окрашенных

ализариновым красным S областей на отсканированных изображениях лунок в программе ImageJ (16). Морфологию клеток и результаты цитохимических реакций анализировали с помощью микроскопа Olympus АН-3 (Япония). Результаты обрабатывали статистически с использованием таблиц Стрелкова (17).

Результаты и обсуждение

Численность и остеогенные потенции КОЕ-Ф, прикрепляющихся к субстрату в различные сроки культивирования. Было проведено сравнительное изучение динамики прикрепления КОЕ-Ф, содержащихся в костном мозге или зародышевой печени, к культуральному пластику и белкам внеклеточного матрикса. Для оценки остеогенных потенций КОЕ-Ф, прикрепившихся и не прикрепившихся к субстрату за первые 7 сут культивирования, в образованных ими колониях была проанализирована активность щелочной фосфатазы, маркирующая ранние стадии остеогенеза. Полученные данные представлены в таблицах 1 и 2.

Как показал подсчет числа колоний, после 7 сут культивирования на пластике часть КОЕ-Ф зародышевой печени и еще более высокая доля КОЕ-Ф костного мозга оставались неприкрепленными. Покрытие флаконов фибронектином или коллагеном I типа значительно повышало долю КОЕ-Ф, прикрепившихся в первые 7 сут; влияние ламинина на динамику прикрепления КОЕ-Ф было выражено слабее. В целом, судя по соотношению числа колоний, образованных прикрепившимися и не прикрепившимися за этот срок клетками, КОЕ-Ф зародышевой печени были более адгезивны к изучаемым белкам, чем КОЕ-Ф костного мозга.

Большая адгезивность МСК из зародышевой печени по сравнению с МСК из костного мозга половозрелого животного может быть объяснена особой ролью, которую играют адгезивные взаимодействия клеток в эмбриогенезе. Возможно, МСК, как и другие клетки зародыша, несут на своей поверхности больше молекул адгезии, чем клетки взрослого животного.

Наши результаты согласуются с данными некоторых авторов, показавших более эффективное прикрепление МСК к коллагену I типа и фибронектину по сравнению с коллагеном IV типа и ламинином (18,19). Эти данные были получены на пассируемых культурах путем оценки общего числа прикрепившихся клеток. Исследование же клонального роста КОЕ-Ф в первичной культуре костного мозга мыши, проведенное американскими учеными, показало, что покрытие культуральной посуды белками матрикса, в том числе коллагеном I типа и фибронектином, не приводит к усиленному прикреплению клоногенных клеток в первые 8 сут культивирования по сравнению с контролем на пластике (20). Сходные

данные получены и в нашей работе, однако они расширены исследованием популяции клеток, прикрепляющихся в более поздний срок культивирования. Именно анализ численности колоний в этой популяции и демонстрирует нам влияние белков внеклеточного матрикса на адгезивные свойства КОЕ-Ф.

Оценка активности щелочной фосфатазы показала, что среди КОЕ-Ф костного мозга, культивируемых на коллагене I типа или ламинине, доля остеогенных клеток сопоставима с таковой на пластике, тогда как на фибронектине она существенно снижена. Доля остеогенных клеток среди КОЕ-Ф из зародышевой печени была крайне низкой независимо от присутствия белков матрикса. Полученные нами данные о сниженных остеогенных потенциях клеток зародышевой печени подтверждаются и в исследованиях других авторов, о чем говорилось выше (10). Интересным является то, что, по-видимому, потенции клеток зародышевой печени к остеогенной дифференцировке настолько низки, что ни один из исследуемых белков внеклеточного матрикса не способен на них повлиять.

Таблица 1. Содержание КОЕ-Ф в культурах МСК из костного мозга и активность щелочной фосфатазы в колониях.

Вариант			Число КОЕ-Ф на 1 млн клеток	Доля колоний, %		
				ЩФ ⁻	≤50% ЩФ ⁺ клеток	>50% ЩФ ⁺ клеток
Опыт 1	Адгезия в 1-ые 7 сут	Пл	3.83±0.91	15.13±6.48	53.55±7.99	31.32±5.93
		Фн	2.25±0.54	49.62±4.62***	35.00±3.32*	15.38±5.73
	Адгезия во 2-ые 7 сут	Пл	4.43±1.40	3.27±1.43	13.43±3.49	83.30±3.01
		Фн	1.28±0.75*	18.17±18.81	37.17±17.20	44.66±21.50

Опыт 2	Адгезия в 1-ые 7 сут	Пл	1.58±0.56	32.93±11.58	27.63±12.97	39.44±6.98
		Лам	1.98±0.41	61.87±11.34	20.42±6.38	17.21±6.03
		Кол	1.02±0.09	56.73±15.05	11.48±6.45	31.79±12.90
	Адгезия во 2-ые 7 сут	Пл	4.70±2.12	14.47±5.51	8.17±1.56	77.36±7.07
		Лам	2.44±0.75	24.87±5.77	12.50±6.14	62.63±5.38
		Кол	0.96±0.34	30.95±15.36	5.33±3.58	63.72±15.36

Примечание. Пл – пластик, Фн – фибронектин, Кол – коллаген I типа, Лам – ламинин, ЩФ – щелочная фосфатаза. Достоверность различий между контролем (пластик) и опытом (белок матрикса): * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$.

Таблица 2. Содержание КОЕ-Ф в культурах МСК из зародышевой печени и активность щелочной фосфатазы в колониях

Вариант			Число КОЕ-Ф на 1 млн клеток	Доля колоний, %		
				ЩФ ⁻	≤50% ЩФ ⁺ клеток	>50% ЩФ ⁺ клеток
Опыт 1	Адгезия в 1-ые 7 сут	Пл	9.20±1.85	92.05±1.11	4.48±0.66%	3.47±0.96%
		Фн	6.28±1.10	95.67±1.41*	2.51±1.13%	1.82±1.23
	Адгезия во 2-ые 7 сут	Пл	4.40±2.45	100	0	0
		Фн	0.15±0.16	100	0	0

Опыт 2	Адгезия в 1-ые 7 сут	Пл	15.38±1.18	94.42±1.86	5.58±1.86	0
		Лам	8.44±2.24**	95.34±1.83	4.66±1.83	0
		Кол	5.70±0.45***	95.52±1.59	4.48±1.59	0
	Адгезия во 2-ые 7 сут	Пл	1.23±0.57	100	0	0
		Лам	1.66±0.99	88.99±11.67	11.01±11.67	0
		Кол	0.06±0.07*	100	0	0

Примечание. Обозначения те же, что в таблице 1.

Дифференцировка МСК костного мозга в остеогенной среде. Заключение о влиянии исследуемых белков внеклеточного матрикса на остеогенные потенции МСК костного мозга, сделанное на основании оценки спонтанной экспрессии щелочной фосфатазы в первичной культуре, подтверждается анализом терминальной остеогенной дифференцировки клеток первого пассажа в индукционной среде. Очаги остеогенеза, представляющие собой плотные скопления клеток с морфологией остеобластов (кубической формы, с рыхлыми ядрами и интенсивной базофилией цитоплазмы) образовывались на всех изучаемых субстратах. Однако количество откладываемых в таких очагах солей кальция на фибронектине было значительно меньшим, чем на пластике, тогда как коллаген I типа и ламинин не оказывали достоверного влияния на минерализацию костного матрикса (см. рисунок).

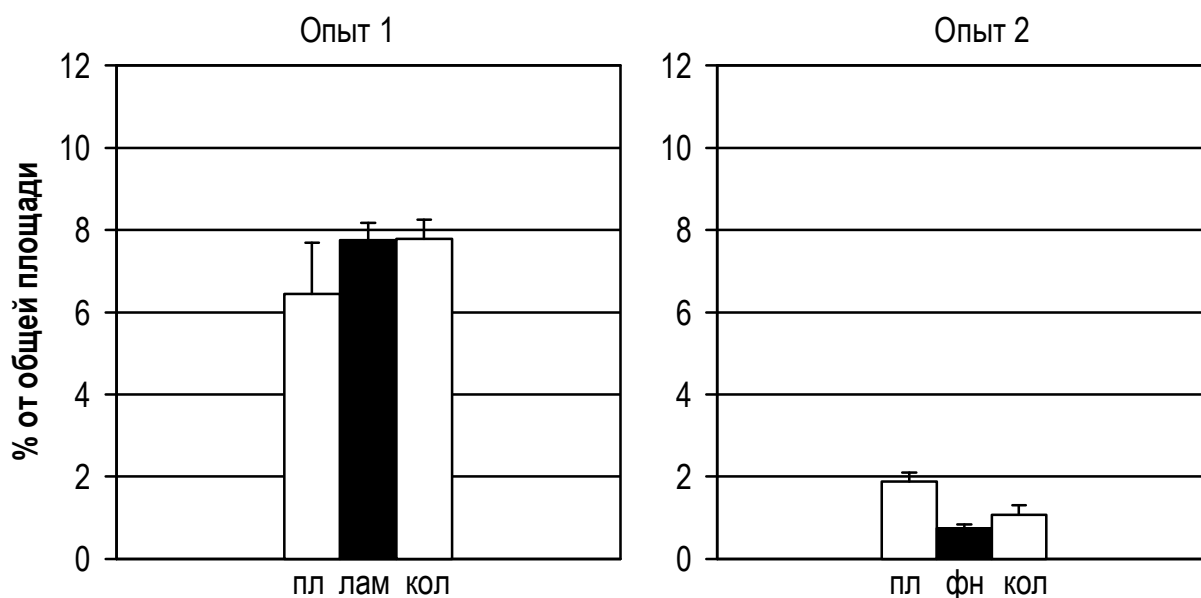


Рисунок. Площадь отложений Ca^{2+} в очагах остеогенной дифференцировки МСК костного мозга на пластике (пл), коллагене I типа (кол), ламинине (лам) и фибронектине (фн).

Наши данные об ингибирующем влиянии фибронектина на остеогенез не согласуются с литературными. Напротив, имеются сообщения, что в культуре остеобластов фибронектин стимулирует остеогенную дифференцировку (21). Мы же наблюдали на фибронектине не только уменьшенную минерализацию в процессе индукции остеогенной дифференцировки МСК, но и сниженные остеогенные потенциалы КОЕ-Ф. При этом интересно, что образование костных узелков на фибронектине происходило, но кальций не откладывался. Возможно, фибронектин замедляет остеогенную дифференцировку в культуре МСК или блокирует ее терминальные стадии. Не исключено также, что высокая способность недифференцированных МСК прикрепляться к фибронектину ведет к преимущественной адгезии к этому субстрату наименее зрелых предшественников, что также влияет на скорость дифференцировки в культуре. Все эти предположения требуют подробного рассмотрения в ходе дальнейшей работы.

Стоит отметить, что для объяснения наблюдаемых нами эффектов необходимо исследовать профиль экспрессии интегринов на поверхности МСК на разных сроках культивирования и в разных средах, поскольку, скорее всего, именно связывание клеток с белками внеклеточного матрикса через интегрин запускает внутриклеточные каскады, приводящие к изменению цитоскелета, потенциалов и митотической активности клеток.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о стимулирующем влиянии изученных белков внеклеточного матрикса на адгезию клоногенных МСК, выражающемся в более раннем прикреплении клеток к субстрату, а также о снижении остеогенных потенциалов МСК при их культивировании на фибронектине. В дальнейших исследованиях будет продолжена оценка влияния белков внеклеточного матрикса на дифференцировку МСК и проанализированы молекулярные механизмы этого влияния.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00002-а) и проекта «Ведущие научные школы» (НШ-1134.2008.4).

Список литературы

1. **Фриденштейн А. Я., Чайлахян Р. К., Лалыкина К. С.** О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворной ткани морских свинок. Цитология, 1970, 12, 9: 1147–1155.
2. **Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N.** Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp. Hematol., 1976, 4: 267–274.
3. **Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 2006, 8: 315–317.
4. **Nathan S., Das De S., Thambyah A., Fen C., Goh J., Lee E.H.** Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. Tissue Eng., 2003, 9, 4: 733–744.
5. **Abedin M., Tintut Y., Demer L.L.** Mesenchymal stem cells and the artery wall. Circ Res., 2004, 95, 7: 671–676.
6. **Nakahara H., Bruder S.P., Goldberg V.M., Caplan A.I.** In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. Clin. Orthop. Relat. Res., 1990, 259: 223–232.
7. **Pierdomenico L., Bonsi L., Calvitti M., Rondelli D., Arpinati M., Chirumbolo G., Becchetti E., Marchionni C., Alviano F., Fossati V., Staffolani N., Franchina M., Grossi A., Bagnara G.P.** Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. Transplantation, 2005, 80, 6: 836–842.
8. **Erices A., Conget P., Minguell J.J.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br. J. Haematol., 2000, 109, 1: 235–242.
9. **Fickert S., Fiedler J., Brenner R.E.** Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. Arthritis Res. Ther., 2004, 6, 5: 422–432.
10. **in't Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A., Kleuburg-van der Keur G., Krusselbrink A.B., van Bezooen R.L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H.H., Fibbe W.E.** Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. J. Hematol., 2003, 88: 845–852.
11. **Minguell J.J., Erices A., Conget P.** Mesenchymal stem cells. Exp. Biol. Med., 2001, 226, 6: 507–520.
12. **Liu G., Hu Y.Y., Zhao J.N., Wu S.J., Xiong Z., Lu R.** Effect of type I collagen on the adhesion, proliferation, and osteoblastic gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Chin. J. Traumatol., 2004, 7, 6: 358–362.
13. **Mizuno M., Kuboki Y.** Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. J. Biochem., 2001, 129, 1: 133–138.
14. **Ponticiello M.S., Schinagl R.M., Kadiyala S., Barry F.P.** Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. J. Biomed. Mater. Res., 2000, 52: 246–255.
15. **Пирс Э.** Гистохимия. Москва, 1962, 962 с.
16. **Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J.** Image processing with ImageJ. Biophoton. Int., 2004, 11: 36–42.
17. **Стрелков Р.Б.** Таблицы Стрелкова и экспресс-метод статистической обработки данных. Москва, 1999, 96 с.
18. **Salasnyk R.M., Williams W.A., Boskey A., Batorsky A., Plopper G.E.** Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. J. Biomed. Biotechnol., 2004, 1: 24–34.

19. **Ogura N., Kawada M., Chang W., Zhang Q., Lee S., Kondoh T., Abiko Y.** Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin. *J. Oral Sci.*, 2004, 46: 207-213.
20. **Phinney D.G., Kopen G., Isaacson R.L., Prockop D.J.** Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J. Cell Biochem.*, 1999, 72: 570–585.
21. **Moursi A.M., Damsky C.H., Lull J., Zimmerman D., Doty S.B., Aota S.-I., Globus R.K.** Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J. Cell Sci.*, 1996, 109: 1369–1380.