

ВЫДЕЛЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ БАЗАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ ИХ СЕЛЕКТИВНОЙ АДГЕЗИИ К БЕЛКАМ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

© О. Г. Спичкина,¹ Н. В. Калмыкова, Л. В. Кухарева, И. В. Воронкина, М. И. Блинова, Г. П. Пинаев

Институт цитологии РАН: ¹ электронный адрес: spich@mail.ru

Эпидермальные клетки кожи человека — кератиноциты — по-разному взаимодействуют с белками внеклеточного матрикса базальной мембраны кожи. Непосредственно с базальной мембраной связаны базальные кератиноциты, представляющие собой стволовые и транзиторные клетки. В процессе дифференцировки базальные кератиноциты изменяют свои адгезивные свойства, теряют непосредственное взаимодействие с базальной мембраной и переходят в вышележащие слои эпидермиса. В связи с этим предполагается, что базальные клетки, и прежде всего стволовые, могут быть выделены из гетерогенной популяции кератиноцитов методом селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса. В настоящей работе проведен анализ степени специфичности взаимодействия кератиноцитов первичной культуры с белками базальной мембраны (коллагенами I и IV типов, ламинином-2/4, фибронектином и матригелем). Показано, что популяция выделенных кератиноцитов содержит клетки с различной способностью к адгезии к перечисленным белкам. Клетки, адгезирующие за короткие сроки, предпочтительнее взаимодействуют с коллагенами и фибронектином, чем с ламинином-2/4 и матригелем; при этом значительная часть таких клеток представлена базальными кератиноцитами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что избранный подход к селекции кератиноцитов может быть использован в дальнейших исследованиях для выделения популяции стволовых клеток кожи.

Ключевые слова: адгезия, базальные кератиноциты, белки внеклеточного матрикса, коллаген, стволовые клетки кожи, фибронектин.

Принятые сокращения: K1, K5, K10 и K14 — соответственно кератины 1, 5, 10 и 14, ЭФР — эпидермальный фактор роста, EHS — саркома мыши (Ehgelbreth-Holm-Sworn).

Кожа состоит из двух слоев — эпидермиса и дермы, которые разделены базальной мембраной, состоящей из элементов внеклеточного матрикса. Эпидермис человека представлен многослойным эпителием, состоящим из 5 основных слоев — базального, шиповатого, зернистого, блестящего и рогового. За счет роста клеток базального слоя эпидермис постоянно обновляется. Среди этих клеток выделяют истинно стволовые и транзиторные, находящиеся на пути к дифференцировке. Предполагается, что ослабление связи клеток с базальной мембраной провоцирует их дифференцировку. Было показано, что через 24 ч после перевода эпидермальных клеток в суспензионную культуру они начинают дифференцироваться (Tenpenbaum et al., 1996). Базальная мембрана, на которой располагаются базальные кератиноциты, представляет собой комплекс белков внеклеточного матрикса, таких как коллагены, ламинин, перлекан, агрин и нидоген, и протеогликанов (Timpl, 1996).

Впервые культуру кератиноцитов получили в 1975 г. Рейнвальд и Грин (Rheinwald, Green, 1975). Сначала клетки культивировали, используя фидерные клетки — мышинные фибробласты линии 3T3 Swiss. В дальнейшем попытались заменить фидерные клетки белками внеклеточного матрикса. Оказалось, что некоторые из них способствуют росту

кератиноцитов в культуре и их можно использовать в качестве субстрата для культивирования кератиноцитов (Adams, Watt, 1990; Горелик и др., 1994). Например, коллаген I типа, фибронектин и фибриноген стимулировали миграцию кератиноцитов (Guo et al., 1990; Chen et al., 1994). При этом фибронектин ингибировал дифференцировку этих клеток. Коллаген IV типа оказывал положительное влияние на их миграцию и прикрепление (Murray et al., 1979), тогда как ламинин-1 замедлял миграцию эпидермальных клеток (Woodley et al., 1988). Адгезия кератиноцитов к субстрату является первым шагом к распластыванию клеток. Переход кератиноцитов к терминальной дифференцировке связан со снижением их аффинности к белкам базальной мембраны (Watt, 1984).

Дифференцировка клеток эпидермиса связана с их постепенными морфобиохимическими изменениями, которые сопровождаются изменениями размера, формы, организации цитоскелета и рецепторов этих клеток. Дифференцировка кератиноцитов *in vivo* характеризуется появлением в их цитоплазме ряда специфических белков, в частности кератинов (K) и инволюкрина. Для клеток базального слоя характерно присутствие K5 и K14 (Nelson, Sun, 1983), для клеток шиповатого слоя — K1 и K10 (Rice, Green, 1979).

Несмотря на наличие в литературе большого количества данных по влиянию белков внеклеточного матрикса на поведение и ростовые характеристики кератиноцитов, остается неясным вопрос о том, какие именно внешние факторы определяют начало их дифференцировки. По-видимому, для решения данного вопроса целесообразно исследовать не всю популяцию кератиноцитов, а именно субпопуляцию базальных клеток. При выделении эпидермальных клеток из кожи ферментативным способом (Rheinwald, Green, 1975) получают гетерогенную популяцию, состоящую из базальных клеток (стволовых и транзисторных) и клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Для их селекции разные авторы используют различные методы.

Один из них — метод дестратификации, который позволяет отделить базальные клетки от дифференцированных. При культивировании эпидермальных кератиноцитов *in vitro* в условиях физиологического содержания Ca^{2+} в среде происходят два процесса одновременно: функциональная дифференцировка клеток и морфогенез (стратификация культуры). Для того чтобы удалить супрабазальные слои, культуру клеток переводят на 24—48 ч на среду с пониженным содержанием ионов кальция, после чего дифференцированные клетки легко снимаются пипетированием (Jensen, Volund, 1988).

Другой способ селекции кератиноцитов основывается на различной адгезии их к ряду белков внеклеточного матрикса. Считается, что первыми из клеток базального слоя адгезируют стволовые клетки. Так, для их отбора используют инкубирование кератиноцитов на смеси коллагена I типа и фибронектина (Hakkinen et al., 2001). Прикрепившиеся за 10 мин клетки культивируют в среде с низким содержанием ионов кальция (0.1 мМ), 9 % сыворотки и с добавлением эпидермального фактора роста (ЭФР) в концентрации 10 нг/мл среды. Предполагается, что такой метод позволяет пассировать культуру без потери пролиферативной активности, жизнеспособности и без изменения исходной морфологии (Hakkinen et al., 2001). Другими авторами показано, что более 50 % кератиноцитов, прикрепляющихся к коллагену IV типа за 10—20 мин, экспрессируют белок р63, являющийся маркером стволовых клеток (Radu et al., 2002; Kim et al., 2004).

Ранее в нашей лаборатории было показано, что ламинин-2/4 больше способствует адгезии кератиноцитов человека, чем ламинин-1 и фибронектин, и в отличие от ламинина-1 поддерживает миграцию этих клеток (Gorelik et al., 2001; Калмыкова и др., 2002). Установлено, что кератиноциты при первом пересеве прикрепляются к субстрату за короткий срок (0.5—2.0 ч), тогда как значительная часть кератиноцитов, полученных сразу после выделения, адгезирует за более длительное время — до 8 ч (Васильев и др., 1991; Калмыкова и др., 2002).

Настоящая работа является продолжением исследований в этой области и посвящена анализу специфического взаимодействия кератиноцитов с рядом белков внеклеточного матрикса с целью отбора популяции базальных кератиноцитов с характеристиками стволовых клеток. Была поставлена задача выявления соотношения базальных и дифференцированных кератиноцитов в гетерогенной популяции клеток, прикрепляющихся к разным субстратам за короткий срок — 30 мин.

Материал и методика

Выделение кератиноцитов. Кератиноциты выделяли из кожи взрослых доноров по методу Рейнвальда (Rheinwald, 1980), модифицированному Юдинцевой и соавторами (Юдинцева и др., 1999). В качестве источника эпидермальных клеток использовали кожу лица, полученную в результате косметологических операций. Кусочки кожи в течение ночи инкубировали в растворе диспазы II в концентрации 0.5 % (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Германия) и коллагеназы гидробионтов в концентрации 0.2 % (ОАО «Технология», Санкт-Петербург) при 4 °С, после чего представлялось возможным механически отделить эпидермис от дермы. Для получения суспензии клеток эпидермис помещали в раствор трипсина в концентрации 0.125 % и версена в концентрации 0.02 % («Биолот», Санкт-Петербург) на 10 мин при 37 °С. Действие фермента ингибировали добавлением сыворотки. Полученную суспензию клеток осаждали при 1000 g в течение 5 мин, удаляли супернатант, затем осадок клеток ресуспендировали в смеси сред DMEM и F12 (3 : 1).

Субстраты. Для экспериментов использовали коллаген I и IV типов, ламинин-2/4, фибронектин и матригель, являющийся комплексом белков внеклеточного матрикса и протеогликанов. Коллаген I типа был получен из сухожилий крысиных хвостов (Chandrakasan et al., 1967), коллаген IV типа — из плаценты человека (Kleinman, 1994). Ламинин-2/4 был выделен из плаценты человека (Palm, Furcht, 1983), фибронектин — из плазмы крови человека (Ruoslanti et al., 1982), матригель — из EHS-саркомы мыши (Kibbey, 1994).

Характеристика адгезии кератиноцитов на различных субстратах. В популяции свежее выделенных кератиноцитов подсчитывали число клеток, прикрепившихся за определенный срок к субстрату, нанесенному на поверхность лунок (Karecla et al., 1994). В этих экспериментах использовали 96-луночные платы (Nunc, США) для иммуноферментного анализа. В каждую лунку наносили 10 мкг субстрата и инкубировали при 4 °С в течение ночи. После этого лунки трижды промывали буферным раствором PBS. Выделенные клетки промывали трижды смесью сред DMEM и F12 (3 : 1) без сыворотки с последующим их осаждением при 1000 g в течение 5 мин. Затем клетки суспендировали в среде без сыворотки и высевали в 96-луночные платы по 10^5 клеток на лунку. Через 20, 30 мин, 2 и 3 ч инкубации неприкрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 70%-ным раствором этилового спирта и окрашивали генциан-виолетом в течение 20 мин. Число клеток, адгезировавших к данному субстрату, определяли по оптической плотности при длине волны 570 нм с помощью прибора Multiscan. Доля адгезировавших кератиноцитов дана в % от количества посеянных клеток.

Иммунофлуоресцентный анализ. Степень дифференцировки кератиноцитов оценивали методом непрямой иммунофлуоресценции по их окраске антителами на кератины. В качестве первых антител использовали моноклональные мышинные антитела на кератины человека (Novocastra Laboratories Ltd., Великобритания), в качестве вторых антител — кроличьи антитела (rabbit anti-mouse Ig G FITC Conjugate, Sigma, США). Для анализа брали покровные стекла, часть которых предварительно силиконизировали (Are et al., 2001). Стекла покры-

вали субстратом в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4 °С, после чего трижды омывали PBS, наносили на них свежeweделенные клетки по 200 тыс. на стекло и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Для определения доли базальных клеток в суспензии только что выделенных кератиноцитов использовали в качестве подложки полилизин-L (Sigma, США). Неприкрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся фиксировали смесью ацетона с метанолом (1 : 1) в течение 5 мин на льду. После удаления фиксатора клетки инкубировали с первыми антителами на кератины в течение 60 мин при комнатной температуре. Для экспериментов использовали моноклональные мышиные антитела к кератинам клеток базального слоя K5 (в разведении 1 : 100) и K14 (в разведении 1 : 20) и антитела к кератинам дифференцировки K10 (в разведении 1 : 50). После отмывки клеток от первых антител для проявления краски на стекла наносили вторые антитела в разведении 1 : 300 и инкубировали 30 мин в темноте. Идентификацию и подсчет окрашенных клеток проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Karl Zeiss Axioscop.

Результаты

Известно, что основная часть свежeweделенных кератиноцитов адгезирует за длительное время — до 8 ч (Васильев и др., 1991; Калмыкова и др., 2002). Клетки базального слоя по сравнению с дифференцированными обладают большей аффинностью к белкам базальной мембраны, что можно объяснить наличием у них специфических рецепторов (Watt, Hertle, 1994), поэтому для селекции базальных кератиноцитов среди общего пула эпидермальных клеток мы выбрали короткий срок — 30 мин. В каждую лунку 96-луночной платы сеяли по 100 тыс. клеток. Обнаруженные различия в адгезии кератиноцитов на разных белках внеклеточного матрикса представлены на рис. 1.

Наиболее адгезивным из рассмотренных субстратов для кератиноцитов оказался коллаген I. За 30 мин к нему прикрепляется в среднем около 16 % клеток всей популяции. К фибронектину прикрепляется меньше клеток — около 12 %. Доля клеток, прикрепившихся за это же время к коллагену IV, составила около 8 %. Из использованных белков внеклеточного матрикса ламинин-2/4 и матригель в меньшей степени способствуют адгезии данной популяции кератиноцитов, на эти белки садится около 7 и 5 % клеток соответственно. В качестве контроля использовали необработанную поверхность пластиковой чашки. В этом случае доля прикрепившихся клеток составила 0.1 %.

Поскольку среди исследуемых белков клетки лучше всего прикреплялись к коллагену I типа и фибронектину, адгезию кератиноцитов к этим белкам исследовали более детально. Были выбраны следующие сроки адгезии — 20, 30 мин, 2 и 3 ч. Данные представлены на рис. 2. Показано, что на коллагене I типа в течение 2 или 3 ч прикрепляется примерно в 2 раза больше клеток, чем за более короткие сроки (20—30 мин), тогда как доля клеток, прикрепившихся к фибронектину за те же сроки, заметно не изменялась. Полученные результаты свидетельствуют, по-видимому, о том, что сначала с коллагеном I типа взаимодействуют базальные клетки, затем начинают прикрепляться и дифференцированные.

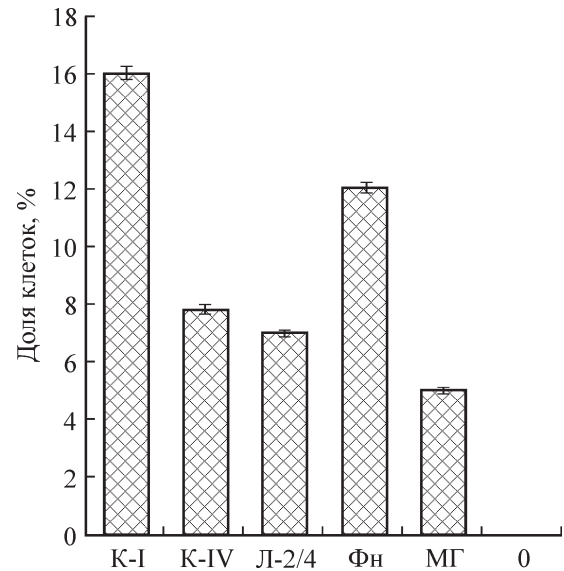


Рис. 1. Адгезия кератиноцитов к коллагену I (К-I) или IV типа (К-IV), ламинину-2/4 (Л-2/4), фибронектину (Фн) или матригелю (МГ) через 30 мин после их посева.

По вертикали — доля прикрепившихся кератиноцитов, % от общего количества посеянных клеток. 0 — контроль (необработанная поверхность пластиковой чашки).

Fig. 1. Adhesion of keratinocytes to collagens of I or IV types, laminin-2/4, fibronectin or matrigel 30 min after their sowing.

Vertically — the fraction of attached keratinocytes, % the total number of sowed cells. 0 — control, not covered surface of a plastic dish.

Для определения соотношения базальных и дифференцированных кератиноцитов в суспензии использовали метод непрямой иммунофлуоресценции. Клетки, прикрепляющиеся за 30 мин, метили моноклональными антителами к маркерам дифференцировки — кератинам K5, K14 и K10 (рис. 3).

На рис. 3 видно, что базальные кератиноциты (положительные по K5 и K14 и отрицательные по K10) мень-

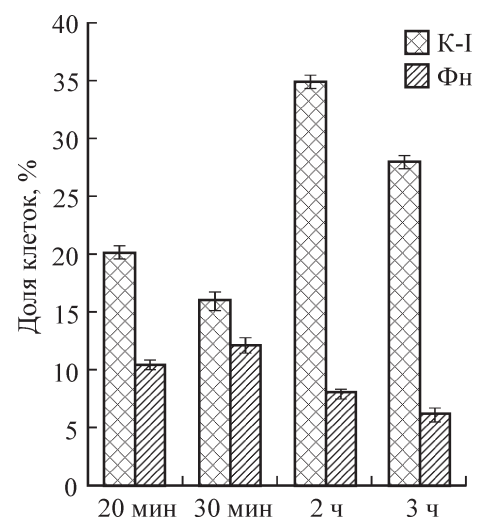


Рис. 2. Адгезия кератиноцитов к коллагену I типа (К-I) или фибронектину (Фн) в разные сроки после их посева.

Fig. 2. Adhesion of keratinocytes to type I collagen (K-I) and to fibronectin (Фн) at different time after their sowing.

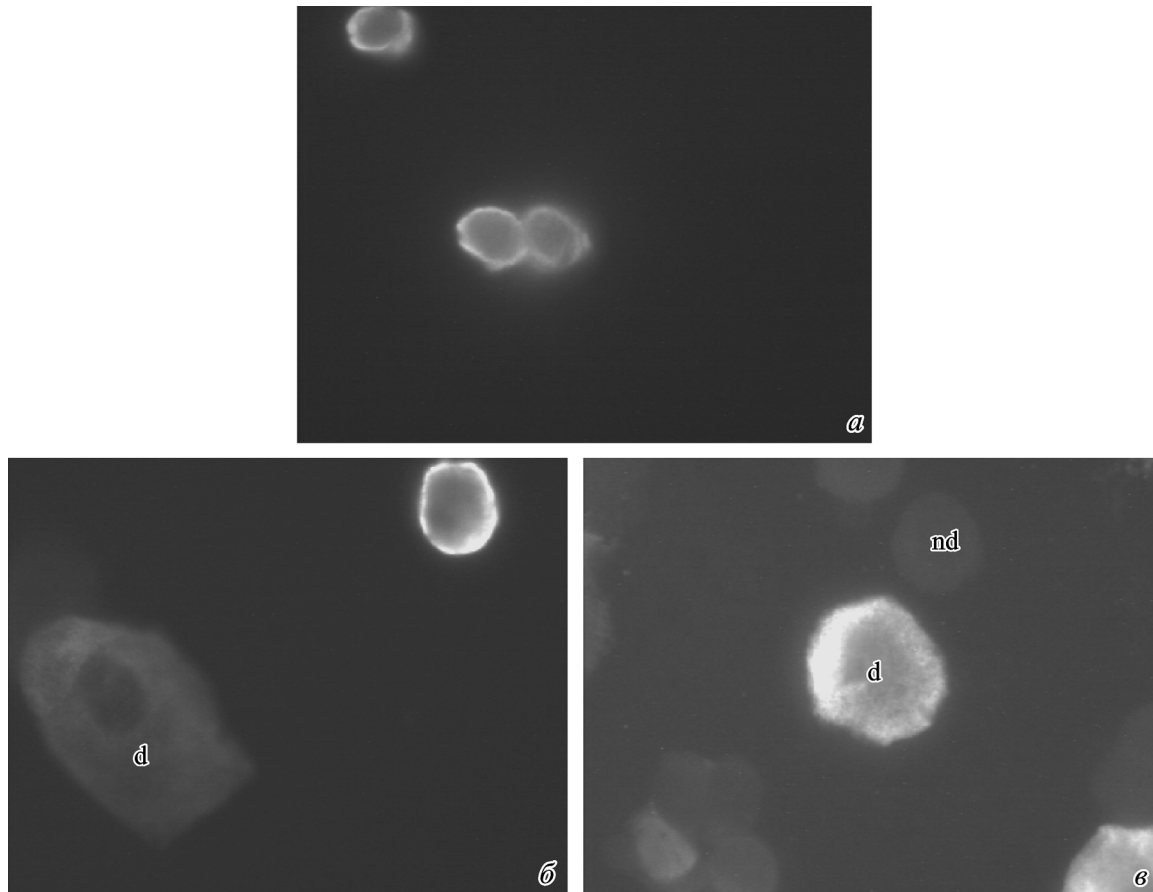


Рис. 3. Окраска кератиноцитов флуоресцентно-мечеными антителами на кератины K5 (а), K14 (б) и K10 (в). K5 и K14 — маркеры базальных кератиноцитов, K10 — маркер дифференцированных кератиноцитов; d — дифференцированная клетка, nd — недифференцированная. Иммунофлуоресцентная микроскопия; об. 100×.

Fig. 3. Keratinocytes stained with antibodies to keratins K5 (a), K14 (b) and to K10 (c). K5 and K14 — markers of basal keratinocytes, K10 — a marker of differentiated keratinocytes, d — differentiated cell, nd — a not differentiated cell. Immunofluorescence microscopy; ob. 100×.

ше в диаметре, чем дифференцированные клетки, и имеют круглую форму, тогда как дифференцированные клетки (положительные по K10) являются более крупными и имеют полигональную форму.

Соотношения базальных и дифференцированных кератиноцитов на силиконизированных и несиликонизированных стеклах не различаются между собой. Для определения доли базальных клеток в суспензии только что выделенных кератиноцитов в качестве подложки использовали неспецифический субстрат полилизин-L. Оказалось, что выделенный из кожной ткани пул клеток содержит около 55 % базальных кератиноцитов и примерно 45 % дифференцированных (рис. 4).

По нашим данным, в течение 30 мин после посева на белки внеклеточного матрикса свежесыведенных из ткани клеток адгезируют в основном базальные кератиноциты, маркерами которых являются K5 и K14 (рис. 5). К коллагенам I и IV типов и фибронектину прикрепляется около 85—90 % базальных клеток. Оставшиеся 10—15 % прикрепившихся клеток характеризуются наличием маркера дифференцировки — K10.

В аналогичных условиях на матригель и ламинин-2/4 садится 70 и 55—65 % недифференцированных кератиноцитов соответственно и около 20—25 % клеток, окра-

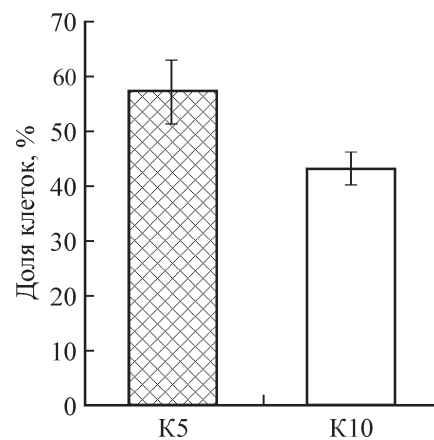


Рис. 4. Соотношение кератиноцитов в исходной суспензии, меченных на кератины базальных (K5) и дифференцированных (K10) клеток.

Fig. 4. Proportion of keratinocytes in the initial suspension stained with antibodies to keratine of basal cells (K5) and of differentiated cells (K10).

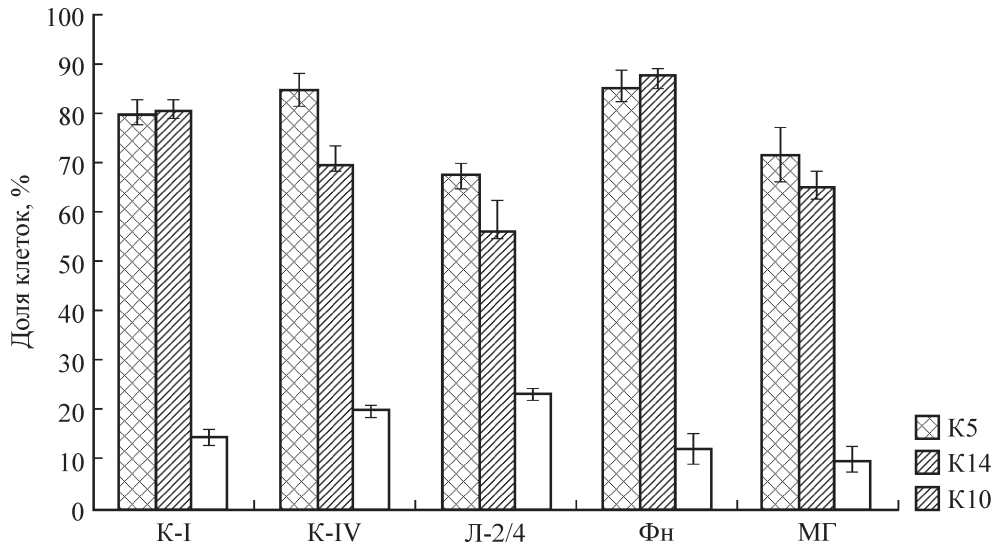


Рис. 5. Соотношение базальных (K5 и K14) и дифференцированных (K10) кератиноцитов в популяции клеток, прикрепившихся за 30 мин к коллагену I (К-I) или IV типа (К-IV), ламинину-2/4 (Л-2/4), фибронектину (Фн) или матригелю (МГ).

Fig. 5. Proportions of keratinocytes stained with antibodies to basal cell keratine (K5 and K14) and to differentiated cell keratin (K10) among cells attached within 30 min to collagens of types I (K-I) or IV (K-IV), laminin-2/4 (Л-2/4), fibronectin (Фн) or matrigel (МГ).

шивающихся на K10. Таким образом, можно сказать, что в течение 30 мин из популяции свежевыделенных кератиноцитов прикрепляются большей частью клетки базального слоя, хотя в этой популяции присутствуют и дифференцированные клетки. При этом клетки базального слоя предпочитают в качестве субстрата коллаген I и IV типов или фибронектин.

Обсуждение

При исследовании эффективности колониеобразования базальных клеток кожи человека *in vitro* было показано, что клетки, быстро адгезирующие к коллагену IV типа, формировали большие колонии (Jones et al., 1995). Данные других авторов (Radu et al., 2002; Kim et al., 2004) свидетельствуют о том, что более 50 % кератиноцитов, адгезирующих к коллагену IV типа за 10—20 мин, экспрессируют белок p63, являющийся маркером стволовых клеток. В культуре эти клетки активно растут и могут формировать колонии. Синтез транскрипционного фактора p63, способность к формированию колоний и ряд других показателей, таких как высокие уровни экспрессии субъединицы $\beta 1$ интегрина, сохранение радиоактивной метки при делении клеток, используются в качестве маркеров стволовых клеток кожи (Jones, Watt, 1993; Pellegrini et al., 2001). Те же авторы показали, что субпопуляция кератиноцитов, экспрессирующих высокий уровень интегринов $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$, обладает большой пролиферативной активностью, а также способностью быстро адгезировать к коллагену IV типа, фибронектину и внеклеточному матриксу, синтезированному кератиноцитами.

В наших экспериментах доля клеток, прикрепившихся к фибронектину, не менялась при изменении срока инкубации. Предположительно к фибронектину адгезирует популяция базальных кератиноцитов, и для этого достаточно 20—30 мин. При исследовании динамики адгезии кератиноцитов на коллагене I типа было обнаруже-

но, что доля клеток, прикрепившихся к субстрату при длительных сроках (2—3 ч) инкубации, увеличивается по сравнению с долей клеток, прикрепившихся за 20—30 мин. По-видимому, это говорит о том, что к коллагену I типа на начальных сроках прикрепляются базальные клетки, затем начинают адгезировать и дифференцированные, так как известно, что у кератиноцитов базального и супрабазальных слоев на начальных этапах дифференцировки имеются рецепторы к коллагену I типа (Watt, Hertle, 1994). У свежевыделенных кератиноцитов отсутствует интегрин $\alpha 5\beta 1$, являющийся классическим рецептором к фибронектину, он появляется только при раневом заживлении и в процессе культивирования. В то же время у небольшой популяции кератиноцитов, растущих в области мышцы, поднимающей волос, есть рецептор $\alpha 8\beta 1$ интегрина, за счет которого клетки могут прикрепляться к фибронектину (Schnapp et al., 1995). По-видимому, именно эта ограниченная популяция клеток адгезирует к данному субстрату за достаточно короткие сроки, и доля клеток, прикрепившихся к фибронектину, со временем не увеличивается.

Вышеперечисленные данные, а также ряд других результатов, полученных при исследовании мышечных кератиноцитов, позволяют говорить о возможности использования теста на адгезию кератиноцитов к белкам, являющимся компонентами базальной мембраны, для выделения базальных клеток из эпидермиса. В литературе есть данные о том, что мышечные эпидермальные стволовые клетки могут быть отобраны по быстрому прикреплению к субстрату и переведены в культуру (Bickenbach, Chism, 1998). В качестве субстрата авторы использовали фибронектин человека, ламинин-5, мышечные коллагены I и IV типов. Было обнаружено, что за 10 мин на этих белках адгезирует почти 10 % популяции базальных кератиноцитов (положительных по K14); при этом клетки, прикрепившиеся к коллагену IV типа за 10 мин, предположительно являются стволовыми (Bickenbach, Chism, 1998).

В наших экспериментах исследуемая популяция кератиноцитов оказалась менее адгезивной по отношению

к ламинину-2/4 и матригелю, чем к фибронектину и коллагенам I и IV типов. Ранее в нашей лаборатории было показано, что ламинин-2/4 способствует адгезии кератиноцитов человека больше, чем фибронектин (Gorelik et al., 2001; Калмыкова и др., 2002). Известно также, что матригель оказывает стимулирующее влияние на прикрепление, распластывание и пролиферацию кератиноцитов крысы в той же степени, что и коллаген I типа (Горелик, 1996). Такие противоречия, по-видимому, можно объяснить тем, что в этих работах исследовали взаимодействие с данными белками всей популяции кератиноцитов, а не отдельной субпопуляции быстро адгезирующих клеток. Кроме того, доля дифференцированных кератиноцитов (положительных по K10) среди клеток, прикрепляющихся к ламинину-2/4 и матригелю за короткий срок, была выше, чем среди клеток, прикрепляющихся к коллагену I и IV типов или к фибронектину. Эти данные свидетельствуют о том, что ламинин-2/4 и матригель не могут быть использованы в качестве субстрата для выделения фракции базальных кератиноцитов человека.

Таким образом, из полученных результатов следует, что в популяции базальных кератиноцитов содержатся клетки с различной способностью взаимодействовать с белками внеклеточного матрикса. При дальнейшей оптимизации условий данный подход, основанный на разной адгезии клеток к различным элементам внеклеточного матрикса, может позволить выделить популяцию недифференцированных клеток из гетерогенной суспензии кератиноцитов. Впоследствии этот прием может быть использован для получения линии стволовых клеток кожи и с целью исследования процессов дифференцировки этих клеток.

Финансирование работы осуществлялось в рамках Государственного контракта № 02.435.11.3020 «Метод восстановления эпителиально-мезенхимальных дефектов с помощью стволовых клеток», шифр «Лот № 2005-ЖС-13.1/001».

Список литературы

- Васильев А. В., Волошин А. В., Терских В. В. 1991. Роль фибрильных клеток в прикреплении и росте кератиноцитов человека и крысы. Цитология. 33 (12) : 84—89.
- Горелик Ю. В. 1996. Влияние элементов внеклеточного матрикса на функциональную активность эпидермальных кератиноцитов в культуре и при заживлении ран: Автореф. канд. дис. СПб. 22 с.
- Горелик Ю. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 1994. Влияние компонентов внеклеточного матрикса на распластывание кератиноцитов крысы на субстрате при культивировании в низкокальциевой среде. Цитология. 36 (12) : 1209—1212.
- Калмыкова Н. В., Черепанова О. А., Горелик Ю. В., Воронкина И. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2002. Различное влияние ламинина-1 и ламинина-2/4 на адгезию и миграцию культивируемых кератиноцитов человека. Цитология. 44 (8) : 792—798.
- Юдинцева Н. М., Горелик Ю. В., Дьяконов И. А., Калмыкова Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 1999. Трансплантация аллогенных эпителиальных пластов на ожоговые раны. Цитология. 41 (3/4) : 328.
- Adams J. C., Watt F. M. 1990. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. Cell. 63 : 425—435.
- Are A. F., Pinaev G. P., Burova E. B., Lindberg U. 2001. Attachment of A-431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. Cell. Motil. Cytoskeleton. 48 : 24—36.
- Bickenbach J. R., Chism E. 1998. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. Exp. Cell Res. 244 : 184—195.
- Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251 : 6062 : 6067.
- Chen J. D., Helmod M., Kim J. P. 1994. Human keratinocytes make uniquely linear phagokinetic tracks. Dermatology. 188 : 6—12.
- Gorelik J. V., Cherepanova O. A., Voronkina I. V., Diakonov I. A., Blinova M. I., Pinaev G. P. 2001. Laminin-2/4 from human placenta is a better adhesion agent for primary keratinocytes than laminin-1 from EHS sarcoma. Cell Biol. Int. 25 : 395—402.
- Guo M., Toda K.-I., Grinnell F. 1990. Activation of human keratinocyte migration on type I collagen and fibronectin. J. Cell Sci. 96 : 197—205.
- Hakkinen L., Koivisto L., Larjava H. 2001. An improved method for culture of epidermal keratinocytes from newborn mouse skin. Meth. Cell Sci. 23 : 189—196.
- Jensen P., Bolund L. 1988. Low Ca²⁺ stripping of differentiating cell layers in human epidermal cultures: an *in vitro* model of epidermal regeneration. Exp. Cell Res. 175 : 63—73.
- Jones P. H., Harper S., Watt F. M. 1995. Stem cell patterning and fate in human epidermis. Cell. 80 : 83—93.
- Jones P. H., Watt F. M. 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. Cell. 73 : 713—724.
- Karecla P. L., Timpl R., Watt F. 1994. Adhesion of human epidermal keratinocytes to laminin. Cell Adhesion Commun. 2 : 309—318.
- Kibbey M. C. 1994. Maintenance of the EHS sarcoma and matrigel preparation. J. Tissue Culture Meth. 16 : 227—230.
- Kim D. S., Cho H. J., Choi H. R., Kwon S. B., Park K. C. 2004. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. Cell Mol. Life Sci. 61 : 2774—2781.
- Kleinman H. K. 1994. Isolation of laminin-1 and type IV collagen from the EHS sarcoma. J. Tissue Culture Meth. 16 : 231—233.
- Murray J. C., Stingl G., Kleinman H. K., Martin G. R., Katz S. I. 1979. Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. J. Cell Biol. 80 : 197—202.
- Nelson W., Sun T. T. 1983. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. J. Cell Biol. 97 : 244—251.
- Palm S. J., Furcht L. T. 1983. Production of laminin and fibronectin by Schwannoma cells: cell-protein interactions *in vitro* and protein localization in peripheral nerve *in vivo*. J. Cell Biol. 96 : 1218—1226.
- Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O., Martinelli E., Fantozzi I., Bondanza S., Ponzin D., McKeon F., De Luca M. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98 : 3156—3161.
- Radu E., Simionescu O., Regalia T., Dumitrescu D., Popescu L. M. 2002. Stem cells (p63(+)) in keratinocyte cultures from human adult skin. J. Cell. Mol. Med. 6 : 593—598.
- Rheinwald J. G. 1980. Serial cultivation of normal epidermal keratinocytes. Meth. Cell Biol. 21A : 229—254.
- Rheinwald J. G., Green H. 1975. Serial cultivation of a strain of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell. 6 : 331—334.
- Rice R. H., Green H. 1979. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. Cell. 18 : 681—694.
- Ruoslahti E., Hayman E. G., Pirschbacher M., Engvall E. 1982. Fibronectin: purification, immunochemical properties and biological activities. Meth. Enzymol. 82 : 803—830.
- Schnapp L. M., Hatch N., Ramos D. M., Klimanskaya I. V., Sheppard D., Pytela R. 1995. The human integrin alpha8beta1 functions as

a receptor for tenascin, fibronectin and vitronectin. *J. Biol. Chem.* 270 : 23 196—23 202.

Tennenbaum T., Li L., Belanger A. J., De Luca L. M., Yuspa S. H. 1996. Selective changes in laminin adhesion and alpha 6 beta 4 integrin regulation are associated with the initial steps in keratinocyte maturation. *Cell Growth Differ.* 7 : 615—628.

Timpl R. 1996. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 : 618—624.

Watt F. M. 1984. Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. *J. Cell Biol.* 98 : 16—21.

Watt F. M., Hertle D. M. 1994. Keratinocytes integrins. In: *The Keratinocytes Handbook*. UK: Cambridge Univ. Press. 153—164.

Woodley D. T., Bachmann P. M., O'Keffe E. J. 1988. Laminin inhibits human keratinocyte migration. *J. Cell. Physiol.* 136 : 140—146.

Поступила 4 V 2006

ISOLATION OF HUMAN BASAL KERATINOCYTES BY SELECTIVE ADHESION TO EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS

O. G. Spichkina,¹ N. V. Kalmykova, L. V. Kukhareva, I. V. Voronkina, M. I. Blinova, G. P. Pinaev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: spich@mail.ru

Epidermal human cells (keratinocytes) differently interact with extracellular matrix proteins of the skin basal membrane depending on the stages of their differentiation. The pool of basal keratinocytes commonly includes stem cells and transient amplifying cells. They directly attach to the skin basal membrane. Keratinocytes change their adhesive properties during differentiation, lose direct interaction with the basal membrane and move to suprabasal epidermal strata. From this, it is suggested that basal and primarily stem cells can be isolated from a heterogenous keratinocyte population due to their selective adhesion to the extracellular matrix proteins. In the current study, we analysed the specificity of interaction between primary keratinocytes and extracellular matrix proteins (collagens of I and IV types, laminin-2/4, fibronectin and matrigel). We have demonstrated that the basal keratinocytes extracted from the skin have different adhesive abilities. The rapidly spreading cells usually interacted with collagen and fibronectin rather than with laminin-2/4 or matrigel. The majority of these cells being represented by basal keratinocytes. Our data demonstrate that the applied method of keratinocyte selection may be directed for precise isolation of skin stem from a common cell population.

Key words: adhesion, basal keratinocytes, collagen, extracellular matrix proteins, skin stem cells, fibronectin.