

ЦИТОСКЕЛЕТ И АДГЕЗИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭФФЕКТОВ МИКРОГРАВИТАЦИИ

© П. М. Гершович, Ю. Г. Гершович, Л. Б. Буравкова

*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва;
электронный адрес: psytech@rambler.ru*

Изменения в структуре цитоскелета во время космического полета и при моделировании микрогравитации обнаружены у различных типов клеток, в том числе лимфоцитов, глиальных клеток, эндотелиальных клеток и остеобластов. В основе одного из предполагаемых механизмов гравичувствительности клетки лежит изменение взаимодействия кластеров интегринов и внеклеточного матрикса. В данном исследовании было изучено влияние моделированной микрогравитации на пространственную организацию актинового цитоскелета, распределение винкулина внутри клеток и экспрессию некоторых типов интегринов и молекул клеточной адгезии мезенхимных стромальных клеток костного мозга человека *in vitro*. Для моделирования эффектов микрогравитации использовали прибор desktop RPM (Dutch Space, Ляйден, Нидерланды). Экспозиция длилась от 30 мин до 120 ч. Выявлено, что актиновый цитоскелет клетки быстро (30 мин) реагирует на микрогравитацию. В последующие сроки экспозиции в RPM (6, 24 и 48 ч) число клеток с измененным актиновым цитоскелетом неуклонно увеличивалось, однако после 120 ч экспозиции клетки частично восстанавливали организацию актинового цитоскелета. Моделирование эффектов микрогравитации приводило к увеличению числа клеток, экспрессирующих интегрин- $\alpha 2$. Также было зарегистрировано снижение числа VCAM-1-положительных клеток и разнонаправленные изменения уровня экспрессии ICAM-1. Таким образом, при изучении влияния эффектов микрогравитации на мезенхимные клетки-предшественники нами показано, что данное воздействие приводит к обратимым изменениям актинового цитоскелета, а также модифицирует адгезионные свойства клеток.

Ключевые слова: моделирование микрогравитации, мезенхимные клетки-предшественники, актиновый цитоскелет, фокальная адгезия, интегрины, молекулы адгезии.

Изменения в структурной организации цитоскелета во время космического полета и при моделировании эффектов микрогравитации обнаружены у нескольких типов клеток, в том числе эндотелиальных клеток, лимфоцитов, глиальных клеток и остеобластов (Buravkova, Romanov, 2001; Guignandon et al., 2001; Lewis, 2002; Kumei et al., 2006). Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются мультипотентными предшественниками стромы костного мозга, способными к дифференцировке по крайней мере в клетки ряда тканей мезенхимного происхождения, а именно хрящевой, костной и жировой тканей, а также в клетки стромы, поддерживающей гемопоэз (Friedenstein et al., 1966; Pittenger et al., 1999). Однако влияние микрогравитации и ее моделей на стромальные клетки-предшественники исследовано недостаточно, хотя представляет несомненный интерес в связи с их уникальными особенностями и участием клеток-предшественников в процессах регенерации и репарации во взрослом организме (Pittenger et al., 1999; Deans et al., 2000). Вместе с тем исследование биологии стволовых и более коммитированных клеток-предшественников может пролить свет на механизмы остеопении, возникающей в условиях космического полета, а также при возрастном остеопорозе.

Согласно данным литературы, цитоскелет клетки и ассоциированные с ним элементы играют основную роль

в рецепции механических сигналов и их трансдукции в клетку (Alpin et al., 1998; Ingber, 1999; Bershadsky et al., 2003). Полагают, что в основе этих процессов могут лежать изменения в пространственной организации актиновых микрофиламентов, возникающие под действием механических факторов, а также напряжения в комплексах фокальной адгезии, ответственных за взаимодействие клетки с субстратом (Ingber, 1999; Bershadsky et al., 2003). Наиболее вероятными кандидатами на роль механочувствительных структур клетки выступают рецепторные белки семейства интегринов (Matthews et al., 2006). Интегрины опосредуют взаимодействие клеток с внеклеточным микроокружением и друг с другом, а также осуществляют взаимосвязь внеклеточного матрикса с цитоскелетом клетки (Miyamoto et al., 1995; Alpin et al., 1998). Примечательно, что на мембране МСК экспрессируется огромное количество молекул адгезии и интегринов, регулирующих различные аспекты функционирования этих клеток, в том числе и их дифференцировочные потенциалы (Pittenger et al., 1999; Deans, Moseley, 2000; Zuk et al., 2002).

Для наземного моделирования *in vitro* эффектов микрогравитации исследователи часто применяют метод клинотатирования, при котором происходит постоянное рандомизированное влияние вектора гравитации на монослой клеток (Buravkova, Romanov, 2001). Более совершен-

ными моделями для воспроизведения влияния микрогравитации на культуры клеток являются 3D-клиностаты и разработанные в Нидерландах так называемые Random Positioning Machine (RPM, Dutch Space, Ляйден, Нидерланды) (Van Loon, 2007), позволяющие достигать значений гравитационного воздействия в центре платформы порядка $10^{-3} G$.

Основной задачей данной работы являлось изучение влияния моделирующей микрогравитации с помощью RPM на структурную организацию основных составляющих цитоскелета культивируемых МСК костного мозга человека, а также экспрессию некоторых типов интегринов и молекул клеточной адгезии.

Материал и методика

Культуры МСК, выделенные из костного мозга человека, были нам любезно предоставлены д. б. н. Ю. А. Романовым (НИИ РКНПК Росмедтехнологий). В работе использовали среду DMEM с концентрацией глюкозы 1 г/л с добавлением 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Биолот, Россия), 2 mM L-глутамина, 12.5 mM HEPES-буфера, 1 mM пирувата натрия (все реактивы фирмы Gibco, США) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Для культивирования использовали культуральные флаконы 9, 25 и 75 см² (Nunc, Дания). Смену среды проводили 2 раза в неделю. Пассирование осуществляли по достижении культурами 90 % конфлюэнта, каждые 7—10 сут клетки рассаживали в соотношении 1 : 3. В экспериментах использовали МСК 7—13-го пассажей, полученные от трех различных доноров.

Для моделирования некоторых аспектов воздействия микрогравитации на культуры клеток *in vitro* использовали прибор desktop RPM (Dutch Space, Ляйден, Нидерланды). В процессе работы прибора происходит рандомизация влияния вектора гравитации за счет вращения двух взаимоперпендикулярных рамок, на которых располагается платформа с образцами, при этом имитируется эффект снижения влияния силы тяжести на культуру клеток. МСК пересаживали в культуральные флаконы за 48 ч до начала эксперимента с плотностью 5—7 тыс. клеток на 1 см² и помещали на платформу RPM на 30 мин, 6, 24, 48 и 120 ч. Перед этим флаконы с клетками полностью заполняли культуральной средой, избегая образования пузырьков воздуха, и герметизовали эластичной пленкой «Парафильм». В целях поддержания кислотно-основного равновесия среды использовали 25 mM HEPES-буфер. Аналогичные манипуляции проводили и с контрольными группами клеток. Во всех сериях экспериментов, описанных ниже, в качестве контролей использовали МСК, культивируемые в горизонтальном положении в статическом состоянии (статический контроль), а для изучения эффекта перемешивания среды часть флаконов с культурами клеток помещали на горизонтальный шейкер со скоростью вращения 60 об/мин.

Иммунофенотипирование МСК осуществляли после 120 ч экспозиции с помощью метода проточной цитофлуориметрии (EPICS XL, Beckman Coulter, США) с использованием конъюгатов моноклональных антител CD49b-FITC, CD29-PE, CD106-PE (BioLegend, США), CD49d-FITC и CD54-FITC (Immunotech Coulter, Франция). Клетки снимали смесью 0.25 % трипсина и 0.05 % ЭДТА, отмывали клетки от среды центрифугированием

на скорости 1000 об/мин, после чего готовили аликвоты по 10^4 клеток в растворе фосфатного буфера Дальбекко (ФБД). Далее, согласно рекомендации фирмы-производителя, к живым клеткам добавляли по 20 мкл конъюгатов антител. Образцы инкубировали 30 мин, после чего анализировали экспрессию исследуемых антигенов, накапливая в одном образце не менее $2 \cdot 10^3$ — $5 \cdot 10^3$ событий. В качестве негативного контроля использовали иммуноглобулины того же изотипа, что и антитела против исследуемого маркера.

Изменения в структурной организации актинового цитоскелета, α - и β -тубулина и винкулина оценивали с помощью метода флуоресцентной микроскопии на микроскопе Axiovert 25 (Carl Zeiss, Германия), оснащенный сопряженной с ним цифровой черно-белой видеокамерой AxioCam HRm. МСК отмывали от среды ФБД, после чего фиксировали клетки ледяным метанолом в течение 5 мин и далее отмывали ФБД. Для предотвращения неспецифического связывания антител перед окрашиванием клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США). Для визуализации фибриллярного актина использовали стандартный краситель TRITC-фаллоидин в концентрации 50 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Клетки инкубировали в рабочем растворе фаллоидина в течение 40 мин, после чего отмывали 3 раза ФБД и анализировали изображение. Организацию микротрубочек цитоскелета оценивали путем окрашивания клеток в течение 1 ч антителами против α -тубулина, конъюгированным с ALEXA-488 в разведении 1 : 100 (Chemicon, США), и β -тубулина, конъюгированным с Cy3 в разведении 1 : 200 (Sigma-Aldrich, США), соответственно. После окрашивания клетки также отмывали 3 раза ФБД. Клетки инкубировали с антителами к винкулину (Chemicon, США) в разведении 1 : 100 в течение 2 ч. После инкубации клетки отмывали от избытка первичных антител 3 раза ФБД и инкубировали 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с FITC (Jackson Immunoresearch, США), и далее отмывали от избытка антител 3 раза ФБД для последующего флуоресцентного анализа.

Результаты

Среди основных структур цитоскелета клетки едва ли не наибольший интерес исследователей привлекает его актиновая составляющая как наиболее лабильная и быстро реагирующая на различные воздействия (Small et al., 1999). Окрашивание с помощью TRITC-фаллоидина позволило нам выявить изменения в пространственной организации актинового цитоскелета уже после 30 мин пребывания культуры МСК в гипогравитационных условиях. На рис. 1 представлены типичные формы изменений в структуре актинового цитоскелета МСК после различных сроков воздействия моделирующей микрогравитации на культуры клеток. Для сравнения приведены микрофотографии клеток из группы статического контроля и экспонированных на шейкере. В обеих контрольных группах клетки имели характерную пространственную организацию пучков актиновых микрофиламентов с хорошо заметными стресс-фибриллами. После 30 мин экспозиции на RPM в опытной группе наряду с нормальными появились клетки с аморфным распределением актина во внутриклеточном пространстве (рис. 1, в). Зачастую подобные изменения структуры актина выражались в его перерас-

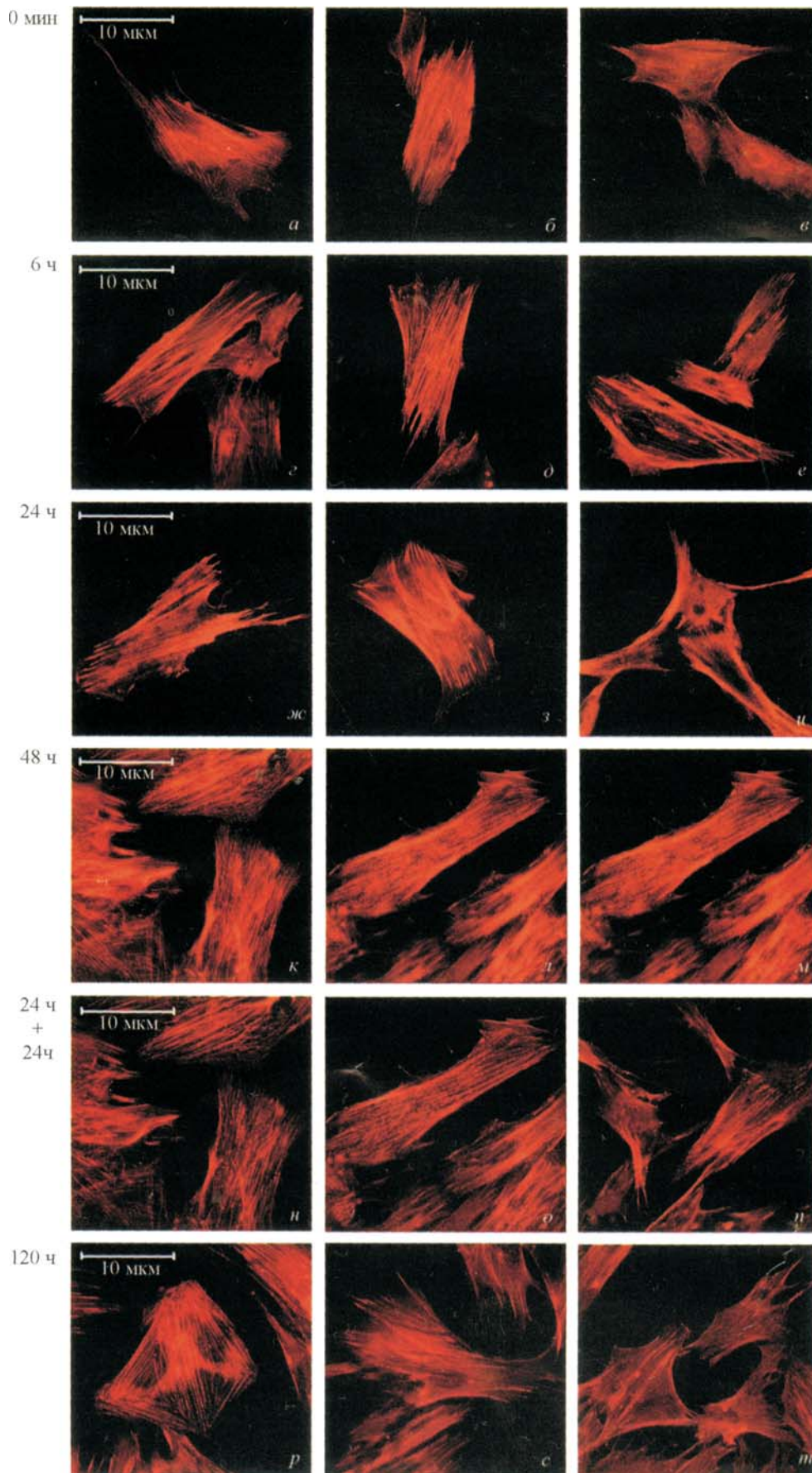


Рис. 1. Структура актинового цитоскелета мезенхимных стромальных клеток-предшественников через различные сроки моделирования эффектов микрогравитации.

30 мин: *a* — статический контроль, *б* — шейкер, *в* — RPM; 6 ч: *г* — статический контроль, *д* — шейкер, *е* — RPM; 24 ч: *ж* — статический контроль, *з* — шейкер, *и* — RPM; 48 ч: *к* — статический контроль, *л* — шейкер, *м* — RPM; 24 ч реадaptации после 24-часовой экспозиции в RPM: *н* — статический контроль, *о* — шейкер, *п* — RPM; 120 ч: *р* — статический контроль, *с* — шейкер, *т* — RPM.

пределении от краев к центру клетки, при этом происходила его декомпактизация и, по-видимому, деполимеризация, приводящая к уменьшению количества фибриллярного актина в клетке. При этом в пространстве клетки отчетливо выявлялись отдельные конгломераты F-актина, а сами клетки теряли стресс-фибриллы. После 6-часовой экспозиции клеток в RPM (рис. 1, *е*) количество клеток с подобными нарушениями в организации актинового цитоскелета возрастало.

Анализ микрофотографий показал, что после 24 ч моделирования эффектов микрогравитации в RPM интенсивность флуоресценции актинсодержащих структур в клетках при одинаковой длине экспозиции снижалась по отношению к таковой в обеих контрольных группах, что может свидетельствовать об истощении пула фибриллярного актина в клетке на данном этапе воздействия

(рис. 1, *и*). Кроме того, изменения в организации актинового цитоскелета были теперь более отчетливыми и выражались уже в его перераспределении от центра к краям клетки, в результате чего в перинуклеарном пространстве возникали характерные «пустоты». Интересно, что в это же время в культуре МСК наблюдалось появление открепленных клеток, а также клеток, которые начинали открепляться от поверхности культурального пластика (рис. 2, *ж*). Аналогичные эффекты отмечали и после 48 ч воздействия, при этом количество открепившихся клеток во флаконах возрастало (рис. 2, *з*).

Примечательно, что после 120 ч пребывания культуры МСК в условиях гипогравитации клетки частично или полностью восстанавливали микроархитектонику актинового цитоскелета, которая на этом временном сроке становилась практически неотличимой от его организации в

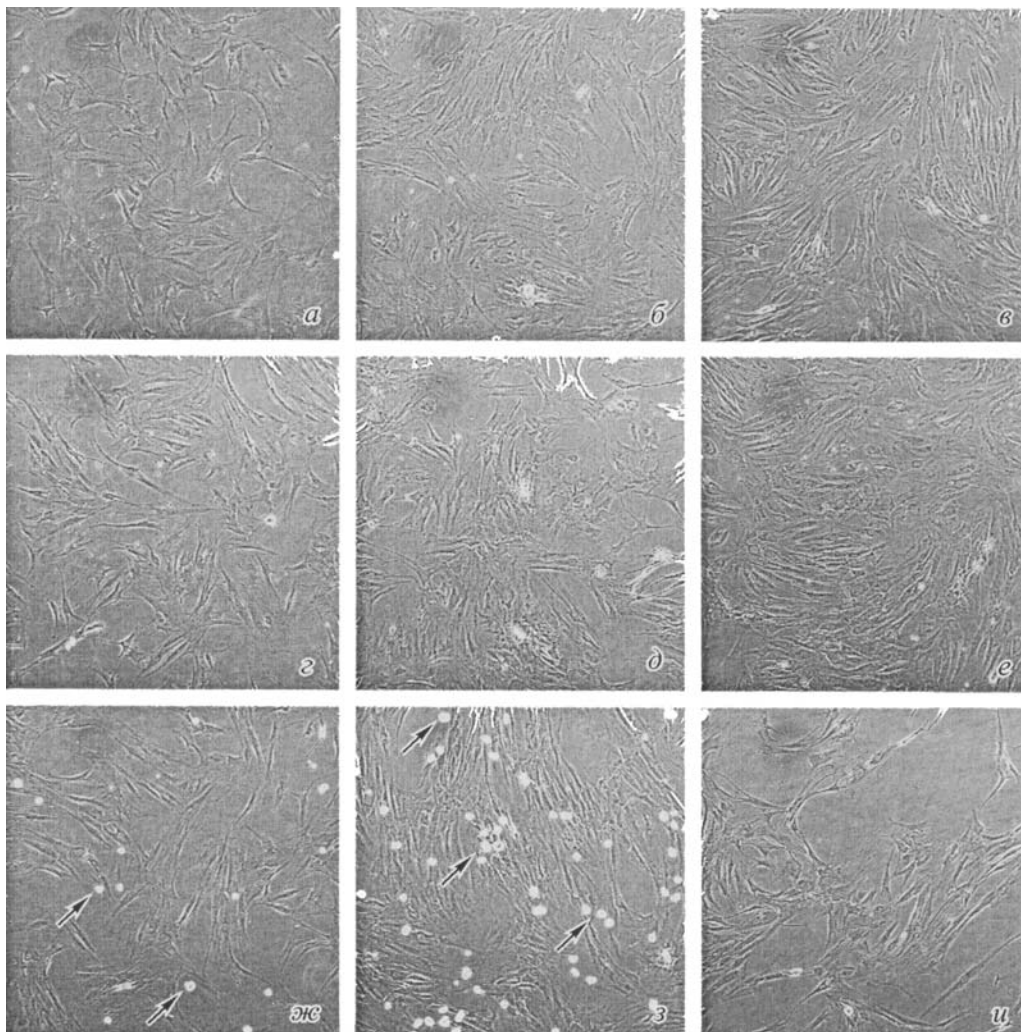


Рис. 2. Изменение адгезионных свойств мезенхимных стромальных клеток костного мозга человека при культивировании в условиях моделирования эффектов микрогравитации.

a—в — статический контроль 24, 48 и 120 ч; *г—е* — шейкер 24, 48 и 120 ч; *ж—и* — RPM 24, 48 и 120 ч; *стрелками* указаны открепившиеся под действием моделированной микрогравитации клетки. Увел. 100×.

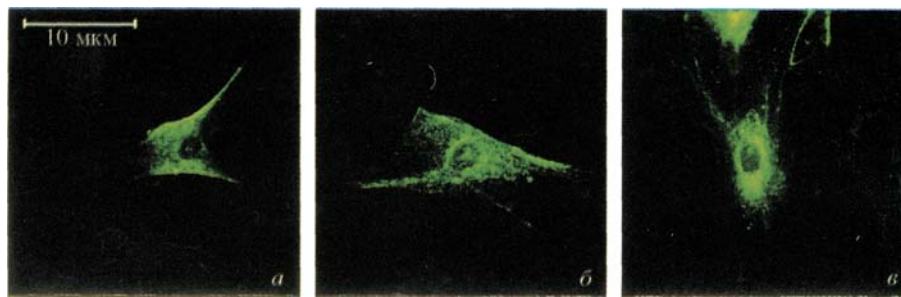


Рис. 3. Перераспределение винкулина у мезенхимных клеток-предшественников через 120 ч культивирования в условиях моделирования эффектов микрогравитации.

a — статический контроль, *б* — шейкер, *в* — RPM.

контрольных группах (рис. 1, *т*). Кроме того, было выявлено, что на данном этапе культивирования открепление клеток от подложки прекращалось (рис. 2, *и*). Такая же картина наблюдалась и после 24-часовой реадaptации клеток в статических условиях, после того как они в течение 24 ч подвергались действию моделированной микрогравитации в RPM (рис. 1, *н*). Подобное восстановление исходной микроархитектуры актинового цитоскелета при достаточно продолжительном пребывании клеток в условиях гипогравитации, вероятно, отражает процесс адаптации клеток-предшественников к измененным параметрам их среды обитания. Подтверждением этого предположения служит наблюдаемый факт аналогичного восстановления структурной организации актина при возвращении клеток к нормальным условиям жизнедеятельности в стандартных статических условиях, а также исчезновение открепленных клеток в культуре.

Винкулин связан с актином в сайтах фокальной адгезии и является одним из основных белков, участвующих в адгезии к субстрату (Alpin et al., 1998). Этот белок сокоаллирован с кластерами интегринов в тех участках, где они прикрепляются к внеклеточному матриксу. Наряду с такими белками цитоскелета, как паксиллин, талин и альфа-актинин, винкулин принимает участие в трансдукции внеклеточных сигналов от интегринов к цитоскелету клетки (Miyamoto et al., 1995; Alpin et al., 1998). Выявление фокальных контактов у клеток-предшественников с помощью иммуноспецифичных антител против винкулина показало, что их организация у МСК отвечает на изменение гравитационных условий среды обитания. По сравнению с актиновой составляющей цитоскелета система фокальной адгезии была более устойчивой, так как в данном случае изменения в организации винкулиновых сайтов адгезии появлялись на более поздних сроках экспозиции.

Характерным проявлением влияния эффектов микрогравитации в данном случае было постепенное перераспределение сайтов фокальной адгезии от равномерно покрывающих всю поверхность (рис. 3, *а, б*) до расположенных преимущественно в перинуклеарном пространстве клетки (рис. 3, *в*). Этот процесс начинался уже через 6 ч после начала воздействия и достигал своего апогея на конечных экспозициях (48 и 120 ч). Следует отметить, что процесс перераспределения винкулиновых сайтов адгезии сопровождался увеличением интенсивности флуоресценции клеток при одной и той же длине экспозиции, что и в контрольных группах. Таким образом, флуоресцентная микроскопия позволила нам также выявить определенные модификации в системе винкулиновых сайтов адгезии у МСК под влиянием факторов, заставляющих адге-

зивные клетки иначе взаимодействовать с субстратом. Динамика этих изменений вполне согласуется с описанным выше процессом ремоделирования структуры актинового цитоскелета у МСК в течение пребывания клеток в условиях гипогравитации.

Основными строительными блоками системы микротрубочек цитоскелета является димер белка тубулина, образованный двумя изоформами α - и β -тубулина (Hall et al., 1983). При использовании флуоресцентной микроскопии нам не удалось выявить выраженные нарушения в структурной организации системы микротрубочек, окрашенных специфичными антителами к α - и β -тубулину, ни на одном из исследуемых сроков экспозиции МСК в RPM (рис. 4). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что тубулин является наименее чувствительной к гравитации структурой цитоскелета клетки у клеток-предшественников, однако нельзя исключать и того, что выбранные нами временные рамки исследования недостаточны для детекции потенциальных изменений.

Адгезия клеток к внеклеточному матриксу и их взаимодействие друг с другом — это две необходимые составляющие пространственной организации и нормального функционирования тканей и органов. Можно допустить, что это положение в равной мере справедливо и для выживания клеток в культуре. Опосредующие клеточную адгезию рецепторы представляют собой мембранные мультибелковые комплексы и представлены следующими классами веществ: селектины, кадгеринины, интегрины и молекулы клеточной адгезии (CAMs), причем все они прямо или через белки-посредники взаимодействуют с актиновым цитоскелетом (Alpin et al., 1998). Интегрины являются гетеродимерными белками, образованными нековалентно связанными друг с другом α - и β -субъединицами (Miyamoto et al., 1995). Связывание интегринов с внеклеточным матриксом ведет к образованию фокальных контактов, кроме того, они принимают участие в узнавании своих корецепторов на других клетках. Молекулы клеточной адгезии образуют адгезионные контакты между клетками и принимают участие в различных клеточных процессах (Alpin et al., 1998). Известно, что МСК экспрессируют на своей мембране широкий спектр кластеров дифференцировки (Pittenger et al., 1999; Deans et al., 2000), вовлеченных в различные аспекты жизнедеятельности стволовых клеток, среди которых интегрины и молекулы клеточной адгезии представляют наибольший интерес с точки зрения гравитационной биологии.

Чтобы определить, как будет соотноситься профиль экспрессии адгезионных рецепторов с обнаруженными

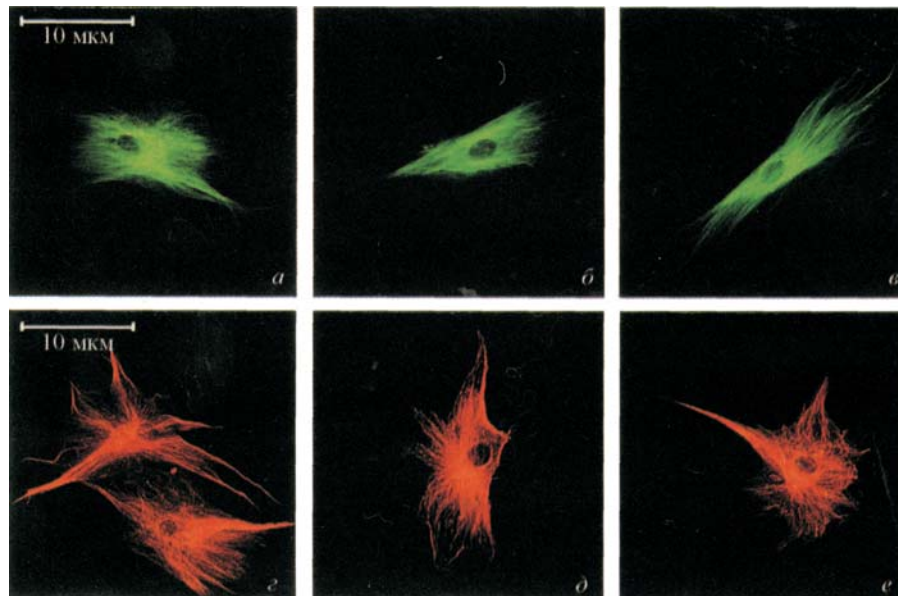


Рис. 4. Структура тубулинового цитоскелета мезенхимных клеток-предшественников через 120 ч культивирования, выявленного с помощью антител к α -тубулину (а–в) и к β -тубулину (z–e).

а, z — статический контроль; б, d — шейкер; в, e — RPM.

изменениями актинового цитоскелета и винкулиновой адгезии клеток, мы измеряли уровень экспрессии интегринов $\alpha 1$ (CD49b), $\alpha 4$ (CD49d), $\beta 1$ (CD29), а также ICAM-1 (CD54) и VCAM-1 (CD 106) с помощью метода проточной цитофлуориметрии после 120-часовой экспозиции МСК на RPM. Эксперименты показали, что количество клеток, экспрессирующих CD29, который является основным β -интегрином МСК, опосредующим адгезию клеток к огромному количеству белков внеклеточного матрикса и молекул адгезии (Deans, Moseley, 2000), оставалось неизменным при выбранной экспозиции. По-видимому, это было связано с тем, что почти вся популяция клеток имела практически 100%-ный уровень экспрессии данного маркера (табл. 1). С другой стороны, в обеих контрольных группах клетки имели очень низкий уровень экспрессии CD49b (табл. 1), лигандами для которого являются коллаген и ламинин, и не экспрессировали CD49d (табл.1), экспрессия которого, однако, показана для МСК из жировой ткани (Zuk et al., 2002). Под влиянием моделированной микрогравитации происходила значительная активация экспрессии CD49b, уровень которого в популяции возрастал в 2–6 раз (табл. 1) в зависимости от пассажа культуры, причем в наибольшей степени у МСК наиболее позднего из исследуемых пассажей.

Интересно, что в случае CD49d также происходила небольшая активация экспрессии данного антигена на одном из исследуемых пассажей (табл. 1), что может свидетельствовать о том, что гипогравитация может приводить к изменению иммунофенотипа МСК за счет увеличения числа клеток, несущих на своей мембране нехарактерный для МСК костного мозга интегрин. Факт увеличения экспрессии пула α -интегринов в популяции клеток-предшественников через 120 ч в условиях измененной гравитации во многом проясняет причины восстановления структуры актинового цитоскелета и возрастания уровня флуоресценции винкулина в сайтах фокальной адгезии у клеток на данном этапе воздействия, так как интегрин

непосредственно взаимодействуют с винкулином и актином в сайтах фокальной адгезии.

Экспрессия ICAM-1 и VCAM-1 (CD54 и CD106) характерна для многих типов клеток, в частности гемопоэтического и эндотелиального рядов (Alpin et al., 1998; Deans, Moseley, 2000). У этих клеток ICAM-1 распознает рецепторы LFA-1 и MAC-1 на лейкоцитах, также взаимодействует с гиалуроновои кислотой и фибриногеном, а VCAM-1 в свою очередь является корецептором для $\alpha 4 \beta 1$ -интегринов моноцитов и лимфоцитов, принимая, таким образом, участие в иммунных реакциях (Alpin et al., 1998; Deans, Moseley, 2000). Роль данных антигенов в жизнедеятельности МСК костного мозга до конца неясна и нуждается в дальнейших исследованиях (Deans, Moseley, 2000). Тем не менее имеются указания на то, что многие молекулы клеточной адгезии участвуют во взаимодействии с актиновым цитоскелетом клетки (Alpin et al., 1998).

Уровень экспрессии ICAM-1 и VCAM-1 в норме сильно варьирует в зависимости от этапа субкультивирования МСК костного мозга человека, изменяясь от достаточно высоких значений у клеток ранних пассажей до низких на более поздних пассажах, возрастая, однако, при дальнейшем пассировании, по крайней мере в случае ICAM-1 (данные не опубликованы). Хотя, например, у

Т а б л и ц а 1

Экспрессия рецепторов адгезии на мембране МСК

Группа	CD29	CD49b	CD49b	CD106
СтК	98.10 ± 0.38	3.18 ± 1.02	0.56 ± 0.38	4.47 ± 1.42
Шейкер	98.13 ± 0.50	2.60 ± 0.67	0.30 ± 0.09	5.40 ± 1.45
RPM	94.97 ± 2.98	8.83 ± 3.37	1.33 ± 1.15	2.25 ± 0.90

Примечание. Представлены усредненные значения экспрессии антигенов у МСК различных пассажей. Данные трех независимых экспериментов представлены как $\bar{x} \pm s_x$. СтК — статический контроль.

Таблица 2

**Экспрессия CD54 на мембране МСК
в зависимости от пассажа клеток**

Пассаж	Группа		
	СтК	шейкер	RPM
7-й	6.4	6.5	3.4
8-й	16.6	23.5	35.8
13-й	13.1	16.4	6.7

Примечание. Указана доля клеток (%), экспрессирующих ICAM-1 у МСК. СтК — статический контроль.

МСК крысы доля клеток, экспрессирующих ICAM-1, остается высокой на протяжении всего периода субкультивирования (Анохина, Буравкова, 2007). Мы изучали влияние моделированной микрогравитации на длительно культивируемые МСК, когда доля клеток, экспрессирующих названные антигены, варьировала в среднем от 3 до 40 %. Оказалось, что моделирование микрогравитации приводит к уменьшению числа клеток, позитивных по VCAM-1, для всех исследуемых пассажей (табл. 1) и в то же время неоднозначно влияет на экспрессию ICAM-1 (табл. 2). Было зарегистрировано, что уровень ICAM-1 также снижается примерно в 2 раза для МСК 7-го и 13-го пассажей и, наоборот, возрастает в 1.5—2 раза у клеток 8-го пассажа. Поскольку ICAM-1 является в известной степени лабильным антигеном, по-видимому, функциональный статус МСК в процессе субкультивирования проявляется в различной реакции клеток на одно и то же воздействие гипогравитации, отражая потребности популяции клеток в экспрессии данного белка на каждом конкретном пассаже.

Обсуждение

Процесс жизнедеятельности и дифференцировка стволовых клеток регулируется многочисленными параметрами их микроокружения и среды обитания, причем в последнее время появляется все больше данных о том, что важную роль в выборе пути дифференцировки стволовой клетки играют не только химические, но и механические факторы (Sordella et al., 2003; McBeath et al., 2004; Meyers et al., 2005; Yuge et al., 2006). Поскольку цитоскелет клетки и связанные с ним компоненты мембранных структур играют основополагающую роль в основных процессах жизнедеятельности и дифференцировки клеток (Alpina et al., 1998; Small et al., 1999; McBeath et al., 2004), нам представлялось интересным узнать, как будет реагировать цитоскелет клеток-предшественников на изменение физических параметров среды обитания. Для этого мезенхимные клетки-предшественники стромы костного мозга экспонировали в условиях, позволяющих моделировать некоторые аспекты микрогравитации, что подразумевает значительное уменьшение или же полное исчезновение потока механических импульсов на клетку, имеющую место при обычной земной гравитации.

Для исследования нами были выбраны короткие, начиная от нескольких минут, и более длинные — часовые и суточные — экспозиции, что позволяло проследить динамику изменений структур цитоскелета во времени. Было обнаружено, что цитоскелет клеток-предшествен-

ников в короткие сроки (начиная от нескольких минут) реагирует на измененный гравитационный фон, что выражается в реорганизации актиновых фибрилл и в последующем возрастании количества винкулиновых сайтов фокальной адгезии. В то же время, несмотря на все попытки, нам не удалось выявить различия в архитектуре микротрубочек цитоскелета МСК на выбранных сроках экспозиции.

Полученные результаты были для нас неожиданными, так как недавно обнаружено, что микротрубочки тубулина солокализуются с сайтами фокальной адгезии и модулируют взаимодействие этих контактов с субстратом в процессах адгезии клеток к субстрату и клеточной подвижности (Small et al., 1999). Нарушение полимеризации тубулинов в растворе *in vitro* было показано в условиях микрогравитации в параболе (Papaseit et al., 2000). У культур клеток изменения микротрубочек, обусловленные микрогравитацией, во многом зависели от типа клеток (Lewis, 2002).

По современным представлениям, именно цитоскелет в интеграции с системой фокальной адгезии участвует в рецепции и трансдукции механических сигналов в клетку (Ingber, 1999; Bershadsky et al., 2003; Matthews et al., 2006). Это положение находит все больше подтверждений в космических исследованиях, поскольку микрогравитация в данном случае может рассматриваться как своего рода снятие механической стимуляции. У клеток нейробластомы человека действие измененной гравитации в параболе и клиностате вызывало модификации в актиновом цитоскелете и системе микротрубочек (Rosner et al., 2006). Исследования, выполненные на клетках остеосаркомы крысы, позволили выявить дезорганизацию актинового цитоскелета клеток, а также изменение в системе винкулиновых сайтов фокальной адгезии как в космическом полете, так и при моделировании эффектов микрогравитации в параболе и клиностате (Guignandon et al., 2001). Космический полет вызывал уменьшение уровня мРНК α -тубулина и некоторых белков внеклеточного матрикса у нормальных остеобластов крысы (Kumei et al., 2006). МСК человека теряли нормальную сеть актиновых микрофиламентов после культивирования в ротационном биореакторе, разработанном НАСА, причем авторы связывали эти изменения с нарушением нормальной работы семейства RhoA-ГТФаз (Meyers et al., 2005). В этом смысле полученные нами результаты согласуются с данными литературы и подтверждают концепцию о потенциальном участии определенных структур цитоскелета клетки в реализации восприятия ею физических стимулов.

Хорошо известно, что иммунофенотип стволовых клеток является одним из самых консервативных показателей их морфофункционального состояния. В частности, в нашей лаборатории было показано, что стромальные клетки-предшественники костного мозга крыс сохраняют стабильный иммунофенотип при длительном субкультивировании (более 50 пассажей) и не изменяют его даже в ответ на воздействие гипоксии (Анохина, Буравкова, 2007). Однако в данном исследовании, а также в ряде подобных работ других авторов регистрировались различные подвижки в экспрессии антигенов МСК, так или иначе опосредующих адгезионные контакты клеток друг с другом и внеклеточным матриксом. Например, японские исследователи регистрировали шестикратное увеличение количества МСК человека, дупль-позитивных по фенотипу HSCAM/ β 1-интегрин (CD44/CD29) и CD44/CD90

после 7 сут культивирования клеток в 3D-клиностате (Yuge et al., 2006).

Исследования, выполненные в космическом полете, показали, что микрогравитация приводит к многократному увеличению уровня мРНК CD44 у стромальных остеобластов крысы (Kumei et al., 2006). Показано, что культивирование МСК человека в течение 7 сут в ротационном биореакторе, разработанном НАСА, в остеогенной среде, приводит к активации геной и белковой экспрессии $\alpha 2\beta 1$ -интегринов (CD49b/CD29) (Meyers et al., 2004). В соответствии с этими данными нам также удалось выявить увеличение количества клеток, несущих на своей поверхности $\alpha 2$ -интегрин (CD49b), уменьшение доли клеток, экспрессирующих VCAM-1, и зарегистрировать разнонаправленные изменения в степени экспрессии ICAM-1 после 5 сут культивирования клеток на RPM. Из вышесказанного следует, что, несмотря на различия в использовании средств для моделирования влияния микрогравитации на клетку, ответы клеток-предшественников на это воздействие, по-видимому, несут универсальный характер и проявляются на уровне экспрессии определенных антигенов, представленных различными классами рецепторов адгезии.

Таким образом, при изучении влияния моделированной микрогравитации с помощью RPM на культивируемые мезенхимные стромальные клетки-предшественники из костного мозга человека нами впервые показано, что данное воздействие приводит к изменениям актинового цитоскелета, которые, тем не менее, являются обратимыми, а также модифицирует адгезионные свойства клеток. Кроме того, обнаруженные функциональные изменения в культуре МСК, включая активацию экспрессии некоторых типов интегринов и изменение профиля экспрессии молекул адгезии, свидетельствуют о механической и гравитационной чувствительности данного типа клеток. Полученные результаты являются важными для дальнейшего исследования биологии стволовых клеток, а также развития представлений о процессах регенерации и репарации в условиях микрогравитации. Роль цитоскелета и ассоциированных с ним элементов в жизнедеятельности стволовых клеток в нестандартных условиях существования, безусловно, нуждается в дальнейших исследованиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Роснауки (контракт 02.518.11.7059) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01607-а).

Список литературы

- Анохина Е. Б., Буравкова Л. Б. 2007. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс. Цитология. 49 (1) : 40—47.
- Alpin A. E., Howe A., Alahari S. K., Juliano R. I. 1998. Signal transductions and signal modulations by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin cell adhesion molecule and selectins. Pharmacol. Rev. 50 (2) : 197—263.
- Bershadsky A. D., Balaban N. Q., Geiger B. 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 19 : 677—695.
- Buravkova L. B., Romanov Yu. A. 2001. The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity. Acta Astronautica. 48 : 647—650.
- Deans R. J., Moseley A. B. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp. Hematol. 28 : 875—884.
- Friedenstein A. J., Piatetzky-Shapiro I. I., Petrakova K. V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J. Embryol. Exp. Morphol. 16 (3) : 381—390.
- Guignandon A., Lafage-Proust M.-H., Usson Y., Laroche N., Caillot-Augusseau A., Alexandre C., Vico L. 2001. Cell cycling determines integrin-mediated adhesion in osteoblastic ROS 17/2.8 cells exposed to space-related conditions. FASEB J. 15 (11) : 2036—2038.
- Hall J. L., Dudley L., Dobner P. R., Lewis S. A., Cowan N. J. 1983. Identification of two human beta-tubulin isotypes. Mol. Cell. Biol. 3 (5) : 854—862.
- Ingber D. 1999. How cells (might) sense microgravity. FASEB J. 13 : 3—14.
- Kumei Y., Morita S., Katano H., Akiyama H., Hirano M., Oyha K., Shimokawa H. 2006. Microgravity signal ensnarls cell adhesion, cytoskeleton, and matrix proteins of rat osteoblasts: Osteopontin, CD44, Osteonectin, and α -Tubulin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1090 : 311—317.
- Lewis M. 2002. The cytoskeleton, apoptosis and gene expression in T-lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity. Cell biology and biotechnology in space. Adv. in Space Biol. Med. 8 : 77—121.
- Matthews B. D., Overby D. R., Mannix R., Ingber D. E. 2006. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. J. Cell Sci. 119 : 508—518.
- McBeath R., Pirone D. M., Nelson C. M., Kiran B., Chen C. S. 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RHOA regulate stem cell lineage commitment. Develop. Cell. 6 : 483—495.
- Meyers V. E., Zayzafoon M., Douglas J. T., McDonald J. M. 2005. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. J. Bone Miner. Res. 20 : 1858—1866.
- Meyers V. E., Zayzafoon M., Gonda S. R., Gathings W. E., McDonald J. M. 2004. Modeled microgravity disrupts collagen I/Integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. J. Cell Biochem. 93 : 697—707.
- Miyamoto S., Teramoto H., Coso O., Gutking J., Burbelo P., Akiyama S., Yamada K. 1995. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecule. J. Cell Biol. 131 : 791—805.
- Papaseit C., Pochon N., Tabony J. 2000. Microtubule self-organization is gravity-dependent. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 8364—8372.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 284 : 143—147.
- Rosner H., Wassermann T., Moller W., Hanke W. 2006. Effects of altered gravity on the actin and microtubule cytoskeleton of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Protoplasma. 229 : 225—234.
- Small J. V., Kaverina I., Krylyshkina O., Rottner K. 1999. Cytoskeleton cross-talk during cell motility. FEBS Lett. 452 : 96—99.
- Sordella R., Jiang W., Chen G.-C., Curto M., Serrleman J. 2003. Modulation of Rho GTPase signaling regulated a switch between adipogenesis and myogenesis. Cell. 113 : 147—158.
- Van Loon J. J. W. A. 2007. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. Adv. in Space Res. 39 : 1161—1165.
- Yuge L., Kajiume T., Tahara H., Kawahara Y., Umeda C., Yoshimoto R., Wu S.-L., Yamaoka K., Asashima M., Kataoka K., Ide T. 2006. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. Stem Cells and Development. 15 : 921—929.
- Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol. Biol. Cell. 13 : 4279—4295.

CYTOSKELETON STRUCTURES AND ADHESION PROPERTIES
OF HUMAN STROMAL PRECURSORS UNDER CONDITIONS OF SIMULATED MICROGRAVITY*P. M. Gershovich, J. G. Gershovich, L. B. Buravkova*Institute for Biomedical Problems RAS, Moscow;
e-mail: psytech@itaec.ru

Cytoskeletal alterations occur in several cell types including lymphocytes, glial cells, and osteoblasts, during spaceflight and under simulated microgravity (SMG). One of the potential mechanisms of cytoskeletal gravisensitivity of a cell is disruption of extracellular matrix and integrin interactions. Therefore, we investigated the effects of SMG on F-actin cytoskeleton structure, vinculin focal adhesions, expression of some integrin subtypes and cellular adhesion molecules in mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from human bone marrow *in vitro*. Simulated microgravity was produced by RPM (manufactured by Dutch Space, The Netherlands). Culture flasks with MSCs were settled on the inner platform of RPM for 30 minutes, 6, 24, 48 and 120 h. The results have shown that actin cytoskeleton is very fast reorganized even after 30 minutes of simulated microgravity. The number of cells with disrupted actin cytoskeleton steadily increased with the increasing exposure time. However these changes were reversible because the cells partly recovered their F-actin structure after 120-hours-exposure. In addition, we observed vinculin redistribution inside the cells after 6 hours and subsequent terms of exposures. This process was accompanied with increasing of fluorescence intensity of cells. The expression of integrin- α 2 increased after exposure in RPM. Also we observed decrease in the number of VCAM-1-positive cells and changes in the expression of ICAM-1. Thus, our findings indicate that SMG leads to reversible microfilament alterations of hMSCs and alters adhesion properties of this type of cells.

Key words: simulated microgravity, mesenchymal precursors, actin cytoskeleton, focal adhesion, integrins, adhesion molecules.
