

## ВЛИЯНИЕ ПЕРВИЧНЫХ АДГЕЗИВНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ФИБРОНЕКТИНОМ НА КЛОНАЛЬНЫЙ РОСТ И ОСТЕОГЕННЫЕ ПОТЕНЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ

© *О. В. Паюшина,<sup>1</sup> О. Н. Хныкова, Н. Н. Буторина, Э. И. Буеверова, А. А. Минин, В. И. Старостин*

*Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва;*

*<sup>1</sup>электронный адрес: payushina@mail.ru*

Взаимодействия с внеклеточным матриксом, одним из основных компонентов которого является фибронектин (Фн), играют важную роль в регуляции роста и дифференцировки клеток. Оценивали влияние Фн и отдельных его доменов на первичную адгезию и остеогенные потенции мезенхимных стромальных клеток (МСК) крысы. Анализ эффективности прикрепления МСК костного мозга или зародышевой печени показал, что на 7-е сут культивирования после посадки на Фн число прикрепившихся клоногенных клеток из обоих источников сопоставимо с таковым на пластике, но содержание их во взвеси, как правило, снижено. При этом популяция МСК из зародышевой печени характеризовалась большей по сравнению с костным мозгом долей клеток, прикрепляющихся к субстрату за этот срок. Показано влияние первичной адгезии к Фн на характер дальнейшей дифференцировки. Так, в культурах МСК костного мозга при использовании первичной адгезии на Фн отмечена сниженная по сравнению с пластиком активность щелочной фосфатазы, а при культивировании в остеогенной среде — значительно меньшее отложение солей кальция в очагах дифференцировки. Как показали эксперименты по культивированию МСК на фрагментах Фн, основную роль в подавлении остеогенеза играет его домен, связывающийся с клеткой.

**Ключевые слова:** мезенхимные стромальные клетки, внеклеточный матрикс, фибронектин, адгезия, остеогенез.

**Принятые сокращения:** БСА — бычий сывороточный альбумин, КОЕ-Ф — колониеобразующие единицы фибробластов, МСК — мезенхимные стромальные клетки, Фн — фибронектин, ЩФ — щелочная фосфатаза.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой недифференцированные клоногенные предшественники, дающие начало клеткам различных типов соединительной и других тканей. Международное общество клеточной терапии рекомендует определять мультипотентные МСК как адгезивные к пластику клетки со специфическим поверхностным фенотипом (CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup> при отсутствии кроветворных маркеров) и потенциями к остео-, адипо- и хондрогенезу (Dominici et al., 2006). МСК, впервые описанные в строме кроветворных органов Фриденштейном и соавторами (Фриденштейн и др., 1970; Friedenstein et al., 1976) как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф), к настоящему времени обнаружены во многих тканях на пре- и постнатальных стадиях онтогенеза (Van Den Heuvel et al., 1987; in't Anker et al., 2003; da Silva Meirelles et al., 2006). По основным характеристикам МСК из разных источников сходны, но между ними имеются и различия. В частности, МСК зародышевой печени отличаются от костномозговых профилем экспрессии генов, а также более высокой скоростью пролиферации и сниженными остеогенными потенциями (in't Anker et al., 2003; Götherström et al., 2005; Guillot et al., 2007; Кожевникова и др., 2008; Fromiguet et al., 2008).

Исследование МСК — одно из актуальнейших направлений клеточной биологии. Выяснение механизмов регуляции их роста и дифференцировки важно как для фундаментальной науки, так и для активно развивающейся в последние годы регенеративной медицины. Существенную роль в функционировании МСК играет их микроокружение, в частности внеклеточный матрикс, взаимодействие с которым влияет на многие аспекты физиологии клеток (Gronthos et al., 2001; Docheva et al., 2007). Однако остается неясным, одинаково ли это влияние для МСК из разных органов и на разных стадиях онтогенеза.

Фибронектин (Фн) является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса как зрелого костного мозга (Van der Velde-Zimmermann et al., 1997), так и развивающейся печени (Amenta, Harrison, 1997). Он представляет собой гликопротеид, состоящий из двух субъединиц с мол. массой по 220—250 кДа каждая, связанных дисульфидными мостиками. Молекула Фн содержит несколько структурно-функциональных доменов, основными из которых являются коллагенсвязывающий, связывающийся с клеткой и С-концевой гепаринсвязывающий домены (Yamada et al., 1986).

Адгезивные взаимодействия Фн с клетками различных типов регулируют их выживание, миграцию, проли-

ферацию и дифференцировку. В частности, показаны усиленное прикрепление и распластывание МСК, культивируемых на Фн (Ogura et al., 2004; Cool, Nurcombe, 2005), повышение их способности к миграции (Rüster et al., 2005), а по некоторым данным, также стимуляция остеогенеза (Sogo et al., 2007) и подавление адипогенеза (O'Connor et al., 2003) в индукционных средах. Однако вопрос о механизме регуляторного действия Фн, в частности о роли различных доменов этого белка в его влиянии на те или иные клеточные процессы в МСК, остается во многом неизученным. Использование в работе с клетками в культуре фрагментов Фн, содержащих индивидуальные домены, с оценкой их биологической активности является перспективным подходом к исследованию этого вопроса. В частности, для других клеток таким образом было установлено, что домен, связывающийся с клеткой, играет главную роль в адгезии клеток различных типов к Фн, однако для их полного распластывания с образованием фокальных контактов и стресс-фибрилл необходим дополнительный сигнал от гепаринсвязывающего домена (Woods et al., 1986; Dalton et al., 1995; Kim et al., 2001; Peterson et al., 2005). Кроме того, гепаринсвязывающий домен препятствует откреплению и апоптозу фибробластов в бессывороточной среде (Jeong et al., 2001). Сообщалось о том, что в адгезии, миграции и дифференцировке клеток может играть роль и коллагенсвязывающий домен Фн (Lesot et al., 1992; Schor et al., 1996; Akimov et al., 2000; Priglinger et al., 2004). Однако по данным некоторых исследований, клетки различных типов могут различаться между собой по механизму взаимодействия с Фн, что выражается в их неодинаковом ответе на одни и те же его фрагменты (Dalton et al., 1995). Большинство сведений о функциях Фн и его доменов получено в экспериментах на фибробластах различного происхождения, остеобластах и других дифференцированных клетках. Аналогичных данных для МСК не хватает.

Цель настоящей работы — сравнительное исследование первичной адгезии КОЕ-Ф костного мозга и зародышевой печени крысы на Фн и на пластике флаконов для культивирования, оценка вклада различных доменов Фн в поддержании клонального роста МСК, а также анализ влияния Фн и его доменов на потенции МСК к остеогенной дифференцировке.

## Материал и методика

**Реактивы.** В работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА),  $\alpha$ -химотрипсин (Sigma, США), бромциан-сефарозу, гепарин-сефарозу, сефакрил S200 (Pharmacia, Швеция), раствор Хэнкса (Биолот, Россия), культуральную среду  $\alpha$ -МЕМ, сыворотку плодов коровы, растворы L-глутамина, антибиотика-антимикотика, пенициллина и стрептомицина, 0.25%-ный трипсин с ЭДТА (HyClone, США), 2-фосфо-L-аскорбат (Fluka, Германия), дексаметазон,  $\beta$ -глицерофосфат натрия, набор для выявления активности щелочной фосфатазы (ЩФ), ализариновый красный S, раствор гематоксилина Гилла (Sigma, США).

**Выделение и протеолиз Фн плазмы крови человека.** Препарат плазмы крови разводили в соотношении 1 : 20 буферным раствором А (10 мМ Трис, рН 7.5, и 150 мМ NaCl) при 37 °С и наносили на колонку с желатин-сефарозой, приготовленной путем иммобилизации растворимой желатины на бромциан-сефарозе. Фн элюи-

ровали 4 М раствором мочевины в буфере А; собранные фракции с оптической плотностью более 0.2 объединяли и двукратно диализовали при 4 °С против 50 объемов буфера А. Полученный раствор Фн доводили буфером А до концентрации белка около 1 мг/мл и добавляли сухой  $\alpha$ -химотрипсин в соотношении 1 : 100 к количеству Фн. Через 1—2 ч инкубации при 37 °С протеолиз останавливали добавлением фенилметилсульфонилфторида. Коллагенсвязывающий фрагмент Фн (60 кДа) выделяли из лизата с помощью аффинной хроматографии на желатин-сефарозе, элюируя его 4 М мочевиной, а гепаринсвязывающий (40 кДа) — на гепарин-сефарозе с последующей элюцией раствором, содержащим 10 мМ Трис, рН 7.5, и 500 мМ NaCl. Раствор белков, не связавшихся ни с желатин-сефарозой, ни с гепарин-сефарозой, использовали для получения фрагмента, взаимодействующего с клеткой (120 кДа). Элюаты с обеих колонок и раствор не связавшихся с ними белков высаливали сухим сульфатом аммония до 80%-ного насыщения, осадок растворяли в 50 мМ цитрате натрия (рН 7.5) и подвергали гель-фильтрации на сефакриле S200, собирая и объединяя фракции, содержащие, по данным SDS-электрофореза, фрагменты с соответствующей молекулярной массой. Растворы Фн и его фрагментов лиофильно высушивали.

**Покрытие культуральной посуды Фн и его фрагментами.** Лиофилизированный Фн растворяли в концентрации 50 мкг/мл в растворе Хэнкса в течение 1 ч при 37 °С и стерилизовали пропусканием через фильтр с диаметром пор 0.2 мкм (Sigma, США). Раствор наносили на дно пластиковых культуральных флаконов площадью 25 см<sup>2</sup> и 12-луночных плат (Greiner, Германия) и высушивали в ламинарном боксе в течение 2 ч. Аналогичным образом флаконы и платы покрывали фрагментами Фн 120, 40 и 60 кДа в той же концентрации. При посеве клеток на посуду, покрытую 120 кДа-фрагментом, к части культур дополнительно добавляли в среду фрагмент 40 кДа до концентрации 50 мкг/мл. Контролем служила непокрытая пластиковая посуда; в эксперименте по культивированию КОЕ-Ф на фрагментах Фн контрольные флаконы инкубировали в течение 2 ч с раствором БСА (50 мкг/мл) для блокирования неспецифической адсорбции Фн из сыворотки на поверхности пластика.

**Анализ клоногенного роста МСК.** В качестве источника клеток были использованы крысы Wistar неинбредного разведения (самки в возрасте 3—5 мес и массой 220—330 г) и их плоды 16 сут развития. Первым днем эмбриогенеза считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. Суспензию клеток костного мозга половозрелых крыс или печени плодов с концентрацией 10<sup>6</sup> кл./мл помещали в культуральные флаконы, предварительно покрытые Фн или его фрагментами, либо в контрольные флаконы. Клетки культивировали при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> в среде  $\alpha$ -МЕМ с 10 % сыворотки плодов коровы с добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика, пенициллина и стрептомицина. Спустя 7 сут проводили смену среды и продолжали культивировать клетки костного мозга в течение 4—5 сут, а клетки зародышевой печени — в течение 1 сут, после чего культуры фиксировали для подсчета колоний и анализа активности ЩФ. В экспериментах по оценке числа КОЕ-Ф, прикрепляющихся к субстрату в разные сроки культивирования, удаляемую при смене среды с неприкрепленными клетками переносили в новые флаконы с тем же покрытием и культивировали в течение 7 (костный мозг) или 5 (зародыше-

Таблица 1

**Численность КОЕ-Ф, прикрепляющихся к субстрату  
в различные сроки культивирования**

Источник клеток	Субстрат	Прикрепившиеся за первые 7 сут		Прикрепившиеся за вторые 7 сут	
		число на 1 млн клеток	доля в общем числе КОЕ-Ф, %	число на 1 млн клеток	доля в общем числе КОЕ-Ф, %
Костный мозг	Пластик	3.83 ± 0.91	47.36 ± 5.46	4.43 ± 0.40	52.64 ± 5.46
	Фибронектин	2.25 ± 0.54	69.83 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.75 <sup>a</sup>	30.17 ± 7.33 <sup>a</sup>
Зародышевая печень	Пластик	9.20 ± 0.85	78.40 ± 0.30	4.40 ± 0.45	21.60 ± 10.30
	Фибронектин	6.28 ± 0.10	98.54 ± 0.57 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.16	1.46 ± 1.57 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Различия с контролем на пластике достоверны,  $P < 0.05$ .

вая печень) сут с последующей фиксацией и реакцией на ЩФ.

Индукция остеогенной дифференцировки МСК. Клетки костного мозга культивировали по вышеописанной методике во флаконах без белкового покрытия. После слияния образовавшихся колоний клетки снимали трипсином и при концентрации  $(1-5) \cdot 10^4$  кл./мл помещали в 12-луночные платы, покрытые Фн или его фрагментами, либо в контрольные непокрытые платы. Клетки культивировали в течение 14—16 сут в среде  $\alpha$ -MEM с 10 % сыворотки плодов коровы с добавлением  $10^{-8}$  М дексаметазона, 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата и 10 мМ  $\beta$ -глицерофосфата натрия, меняя среду дважды в неделю. Контролем без индукции остеогенеза служили клетки, культивируемые в среде  $\alpha$ -MEM с 10 % сыворотки плодов коровы.

Цитохимические исследования. Для оценки активности ЩФ культуры фиксировали смесью цитрата, ацетона и формальдегида и проводили реакцию азосочетания прочного красно-фиолетового FRV с нафтолом AS-VI согласно протоколу фирмы-производителя. В экспериментах по индукции остеогенеза культуры фиксировали этанолом (96 %) и выявляли отложения солей кальция путем окрашивания ализариновым красным S в течение 10 мин при pH 4.1 (Пирс, 1962). Ядра докрашивали гематоксилином.

Анализ результатов. Содержание КОЕ-Ф в изучаемых клеточных популяциях определяли подсчетом колоний, содержащих не менее 50 клеток; эффективность клонирования выражали как число КОЕ-Ф на  $10^6$  посаженных клеток. Морфологию клеток и результаты цитохимических реакций анализировали с помощью микроскопа Olympus AN-3 (Япония). Степень минерализации очагов остеогенеза определяли путем измерения площади областей, окрашенных ализариновым красным S, на отсканированных изображениях лунок с помощью программы ImageJ (Abramoff et al., 2004). Результаты обрабатывали статистически с использованием таблиц Стрелкова (1999).

### Результаты

Численность и остеогенные потенции КОЕ-Ф в популяциях клеток костного мозга и зародышевой печени, различающихся по скорости прикрепления к Фн. Эффективность клонирования субпопуляций КОЕ-Ф, прикрепившихся к

пластику или Фн в течение 1-й и 2-й нед культивирования, представлена в табл. 1. Колонии, образуемые на обоих субстратах клетками костного мозга, состояли из типичных фибробластов вытянутой или отростчатой формы и, как правило, были более однородны по величине и плотности для КОЕ-Ф, прикрепившихся во вторые 7 сут, по сравнению с прикрепившимися в более ранний срок. КОЕ-Ф из печени плодов независимо от срока прикрепления давали гетерогенные по размеру и плотности колонии, содержащие не только типичные фибробласты, но и очень крупные сильно распластанные клетки. В культурах зародышевой печени встречались также колонии, состоящие из плотно упакованных полигональных клеток; и на пластике, и на Фн их было не более 2 % от общего числа колоний. При сравнении культур КОЕ-Ф из обоих источников, растущих на пластике и Фн, явной зависимости размера и плотности колоний или морфологии клеток от субстрата первичной адгезии выявлено не было.

Иная картина наблюдалась при сравнении остеогенного потенциала клеток, адгезированных на пластик и на Фн. Цитохимическая оценка активности ЩФ, маркирующей ранние стадии остеогенеза, выявила ингибирующее влияние Фн на содержание остеогенных клеток в колониях, образуемых КОЕ-Ф костного мозга. На обоих субстратах большинство колоний содержало клетки с положительной реакцией на ЩФ, но на Фн доля таких клеток в составе колонии была, как правило, ниже, а реакция в них слабее, чем на пластике (рис. 1, а—г). Соотношение числа колоний с различной окрашиваемостью на ЩФ указывало на меньшую выраженность остеогенных потенций у КОЕ-Ф, адгезированных на Фн, по сравнению с таковыми на пластике. Так, КОЕ-Ф костного мозга, прикрепившиеся к Фн в первые 7 сут, давали  $49.62 \pm 4.62$  % не окрашенных на ЩФ колоний, что превышало ( $P < 0.001$ ) их долю на пластике ( $15.13 \pm 6.48$  %). Та же тенденция наблюдалась и среди менее адгезивных клеток, прикрепившихся в последующие 7 сут: на пластике подавляющее большинство образованных ими колоний ( $83.30 \pm 3.01$  %) было окрашено на ЩФ полностью или почти полностью; на Фн таких колоний было лишь  $44.66 \pm 21.50$  %.

В то же время в культурах зародышевой печени реакция на ЩФ отмечалась как очень слабая и лишь в отдельных клетках или мелких группах клеток некоторых колоний, предшественники которых прикреплялись к субстрату в первые 7 сут (рис. 1, д—з). При этом доля колоний, содержащих остеогенные клетки, была низкой и не зависела от присутствия Фн: в высокоадгезивной популяции



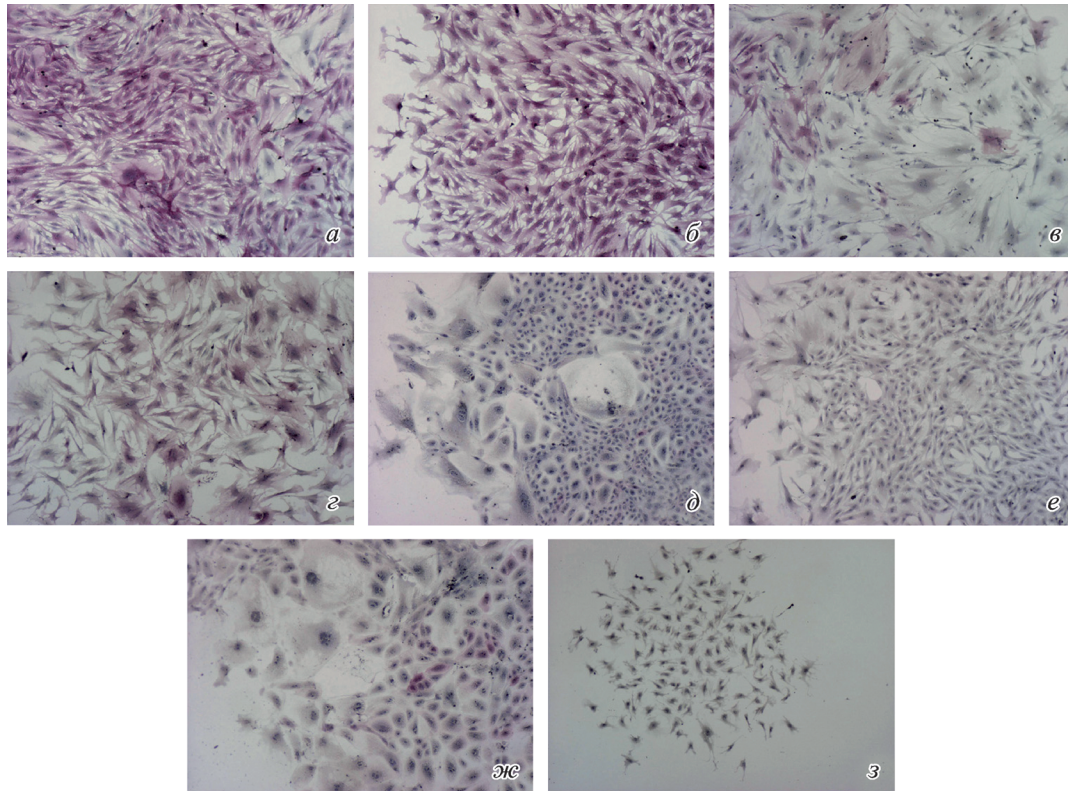


Рис. 1. Колонии, образованные КОЕ-Ф костного мозга и зародышевой печени на пластике и фибронектине (Фн) из плазмы человека.

*a, б* — КОЕ-Ф костного мозга на пластике; *в, з* — КОЕ-Ф костного мозга на Фн; *д, е* — КОЕ-Ф зародышевой печени на пластике; *ж, з* — КОЕ-Ф зародышевой печени на Фн; *a, в, д, ж* — прикрепившиеся за первые 7 сут; *б, з, е, з* — прикрепившиеся за вторые 7 сут. Цитохимическая реакция на щелочную фосфатазу (ЩФ), ядра докрашены гематоксилином. Об. 4×.

$4.33 \pm 1.41$  % образовавшихся на нем колоний содержали клетки с положительной реакцией, на пластике же их доля составляла  $7.95 \pm 1.11$  %. В малоадгезивной популяции активность ЩФ отсутствовала как на пластике, так и на Фн.

Клональный рост КОЕ-Ф костного мозга на фрагментах Фн. Для выяснения роли функциональных доменов Фн в его влиянии на адгезию и клональный рост МСК мы сравнили образование колоний клетками костного мозга, прикрепившимися за первые 7 сут к

Фн из плазмы человека и к фрагментам Фн с мол. массой 40, 60 или 120 кДа, содержащих соответственно С-концевой гепаринсвязывающий, коллагенсвязывающий и связывающийся с клеткой домены. Однако преимущественной адгезии КОЕ-Ф к какому-либо фрагменту обнаружено не было: на каждом из них, а также при сочетании на поверхности флакона фрагментов 40 и 120 кДа в среде число колоний было сопоставимо с таковым в случае интактного Фн. При этом ни один субстрат не повышал эффективность клонирования по сравнению с контрольными

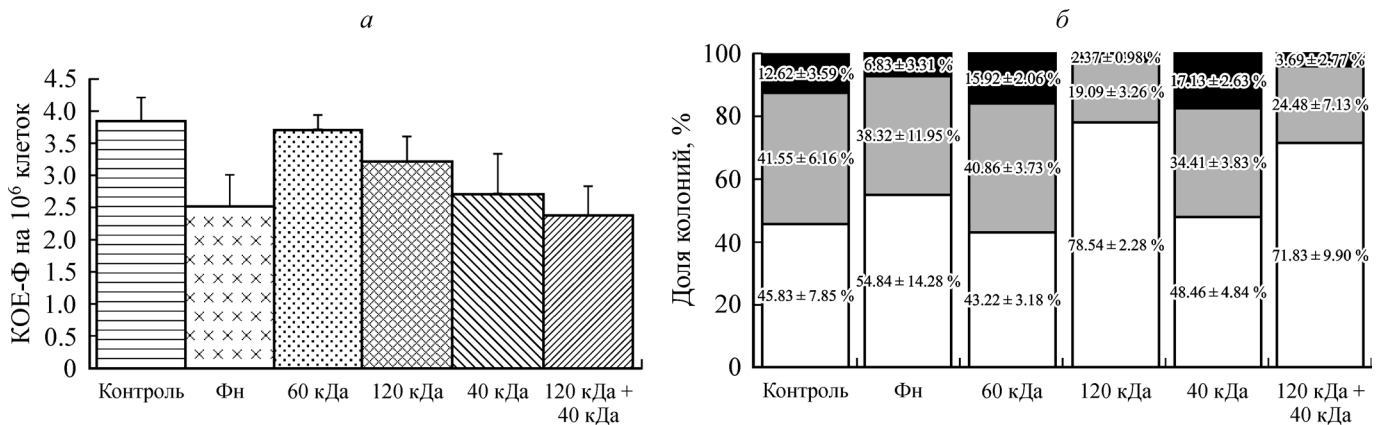


Рис. 2. Влияние фрагментов Фн с разной молекулярной массой (40, 60 и 120 кДа) на КОЕ-Ф костного мозга.

*a* — эффективность клонирования; *б* — соотношение колоний с различной выраженностью экспрессии ЩФ; в каждом столбце снизу вверх: белым цветом обозначена доля колоний, лишенных активности ЩФ, серым — доля, содержащая не более 50 % ЩФ<sup>+</sup>-клеток, черным — доля с преобладанием ЩФ<sup>+</sup>-клеток.



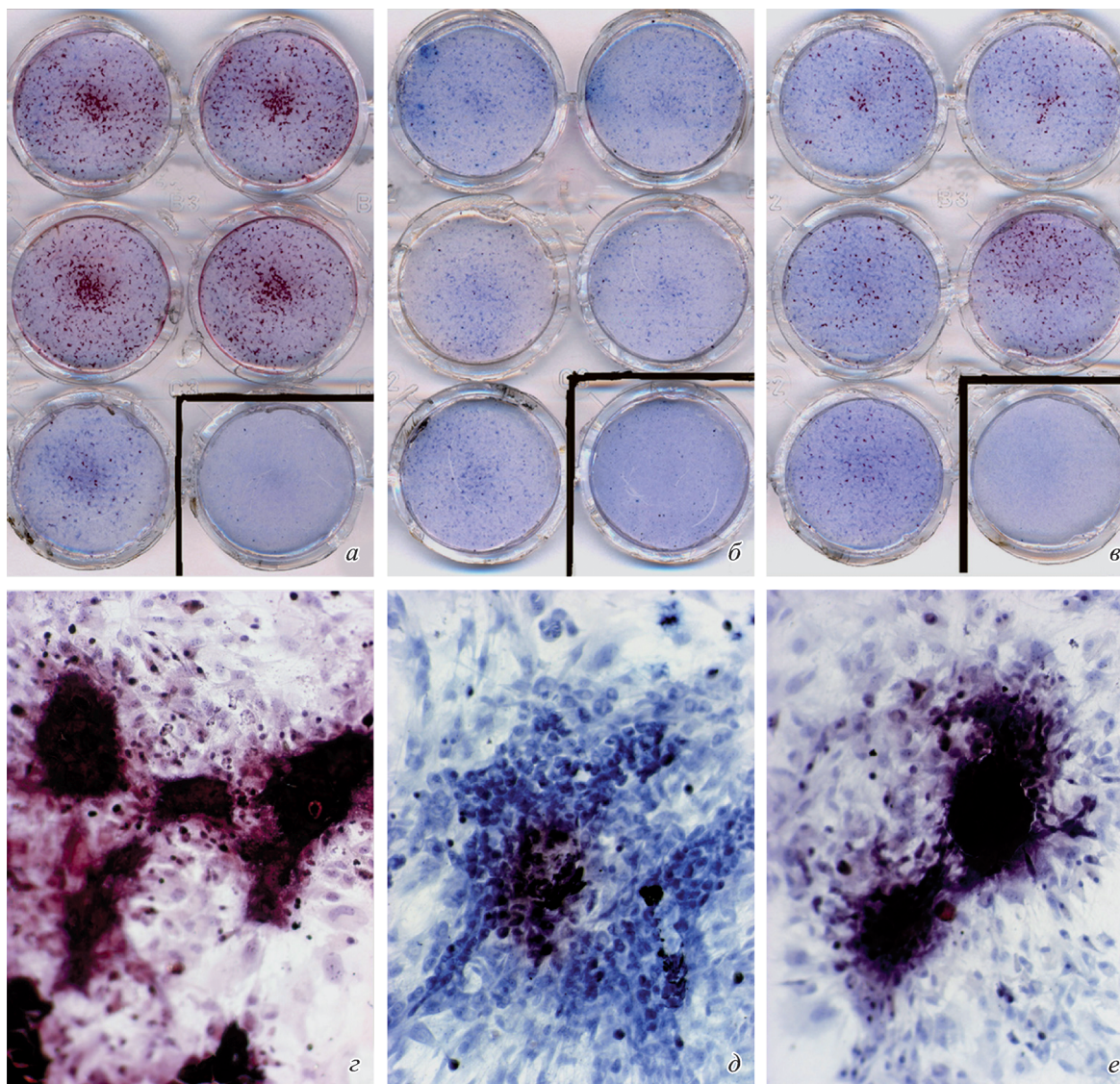


Рис. 3. Дифференцировка МСК костного мозга в остеогенной среде.

Общий вид культур: *a* — на пластике; *б* — на Фн; *в* — на фрагменте Фн 120 кДа (правые нижние лунки — контроль без индукторов остеогенеза). Очаги остеогенеза: *з* — на пластике; *д* — на Фн; *е* — на фрагменте 120 кДа. Окраска ализариновым красным S и гематоксилином. Об. 10X.

ми флаконами, покрытыми БСА (рис. 2, *a*). Явных различий в морфологии культур, растущих на разных фрагментах Фн, не отмечено. Однако на фрагменте 120 кДа (как в присутствии фрагмента 40 кДа, так и без него) доля окрашенных на ЩФ колоний была ниже, чем в контроле, тогда как фрагменты 40 и 60 кДа на нее не влияли (рис. 2, *б*). Данный результат свидетельствует о том, что в снижении остеогенных потенциалов КОЕ-Ф при первичной адгезии на Фн главную роль играет его домен, связывающийся с клеткой.

Влияние Фн и его фрагментов на остеогенную дифференцировку МСК костного мозга. В целях дальнейшего изучения влияния Фн и его доменов на остеогенные потенциалы МСК мы сравнили дифференцировку клеток костного мозга, адгезированных на Фн, Фн и его фрагментах, в остеогенной среде. Через 14—16 сут индукции остеогенеза на всех субстратах образовывались плотные скопления клеток с морфологией остеобластов — кубические, с интенсивно базофильной цитоплазмой (рис. 3). На пластике в центре

большинства таких очагов присутствовали отложения минерализованного матрикса, содержание солей кальция в которых, судя по окрашиванию ализариновым красным S, значительно варьировало. На Фн также встречались многочисленные очаги остеобластоподобных клеток, но лишь немногие из них содержали соли кальция, причем, как правило, в небольшом количестве. На фрагменте 120 кДа (особенно в сочетании с фрагментом 40 кДа в среде) остеогенные узелки также были минерализованы слабее, чем на пластике; на фрагментах 40 и 60 кДа подавления остеогенеза не было (табл. 2).

## Обсуждение

Как известно, адгезия клеток на внеклеточный матрикс сопровождается образованием фокальных контактов и перестройкой цитоскелета, что ведет к изменению активности генов, результаты которого различны для разных типов клеток. Для многих клеток прикрепление

к поверхности служит необходимым условием вступления в цикл; кроме того, адгезивные взаимодействия с матриксом могут влиять на дифференцировку, что было неоднократно показано и для МСК (O'Connor et al., 2003; Salasznyk et al., 2004; Chen et al., 2007; Docheva et al., 2007).

В настоящей работе исследовали регуляторное действие Фн — одного из важных компонентов микроокружения МСК. Эти клетки, как и ряд других, продуцируют тканевую форму Фн, откладываемую на их поверхности и в матриксе (Van der Velde-Zimmermann et al., 1997). Подобное локальное воздействие Фн мы и стремились воспроизвести, покрывая им поверхность культуральной посуды. Мы не обнаружили отмеченных другими авторами (Ogura et al., 2004; Salasznyk et al., 2004) количественных различий в адгезии МСК к контрольному субстрату (непокрытый пластик или БСА) и к Фн. В упомянутых работах влияние Фн оценивали через 10—50 мин инкубации клеток на субстрате, тогда как применяемый нами клональный анализ предполагает более длительное культивирование, в течение которого действие предварительно нанесенного на поверхность Фн может нивелироваться влиянием этого и других адгезивных белков, адсорбированных из сыворотки и (или) секретированных клетками. В частности, есть данные о том, что различия в аффинности МСК к Фн и другим белкам матрикса исчезают уже через 3 ч культивирования (Cool, Nurcombe, 2005). Следует также иметь в виду возможность открепления экзогенного Фн с поверхности или разрушения его протеолитическими ферментами клеток в процессе культивирования.

Наши результаты согласуются с сообщениями ряда авторов (Phinney et al., 1999; Chen et al., 2007), не обнаруживших усиленного прикрепления КОЕ-Ф костного мозга мыши к Фн по сравнению с прикреплением к пластику. Эксперименты по сравнению эффективности клонирования КОЕ-Ф на различных фрагментах Фн не выявили домена, играющего определяющую роль в адгезии МСК к этому белку: ко всем трем его фрагментам прикреплялось сходное число клоногенных клеток. Как известно, адгезия фибробластов к Фн опосредована в первую очередь его доменом, связывающимся с клеткой (Woods et al., 1986; Jeong et al., 2001). В частности, для КОЕ-Ф костного мозга показано взаимодействие с Фн через рецептор этого домена — интегрин  $\alpha 5\beta 1$  (Gronthos et al., 2001). Однако в адгезии клеток к Фн могут участвовать и другие его домены, в частности коллагенсвязывающий, обеспечивающий прикрепление и распластывание МСК (Song et al., 2007) и других типов клеток (Akimov et al., 2000; Priglinger et al., 2004) через тканевую трансглутаминазу на их поверхности. Мы не обнаружили в литературе данных об адгезии МСК к гепаринсвязывающему домену Фн, однако есть данные о прикреплении к нему эмбриональных фибробластов (Woods et al., 1986) и остеобластов (Dalton et al., 1995). В качестве рецепторов к этому домену рассматриваются трансмембранные протеоглики, прежде всего синдеканы (Woods et al., 1986; Jeong et al., 2001), а также интегрин  $\alpha 4\beta 1$  (Peterson et al., 2005). Присутствие данных молекул на поверхности МСК (Gronthos et al., 2001; Djouad et al., 2007) позволяет предполагать возможное участие гепаринсвязывающего домена во взаимодействии Фн с этими клетками. Не исключено, что образование колоний на исследуемых нами фрагментах Фн обусловлено прикреплением КОЕ-Ф к субстрату посредством вышеупомянутых рецепторов, однако для окончательных вы-

Таблица 2

## Остеогенная дифференцировка МСК костного мозга на различных субстратах

Номер опыта	Субстрат	Площадь отложений $\text{Ca}^{2+}$ , %
1	Пластик	$0.13 \pm 0.06$
	Фибронектин	$0.02 \pm 0.01$
2	Пластик	$1.77 \pm 0.28$
	Фибронектин	$0.14 \pm 0.01^a$
	Фрагмент 120 кДа	$0.74 \pm 0.15^b$
	Фрагмент 40 кДа	$2.40 \pm 0.36$
	Фрагменты 120 и 40 кДа	$0.06 \pm 0.01^a$
3	Пластик	$1.88 \pm 0.21$
	Фибронектин	$0.75 \pm 0.09^a$
	Фрагмент 60 кДа	$1.79 \pm 0.45$

Примечание. Выраженность дифференцировки оценивали по площади поверхности, занятой отложениями  $\text{Ca}^{2+}$ . Площадь кальцифицированных областей выражена в процентах от общей площади поверхности лунки. Достоверность различий с контролем: <sup>a</sup>  $P < 0.001$  или <sup>b</sup>  $P < 0.01$ .

водов требуется более детальное изучение механизма адгезии.

Тем не менее использованные нами экспериментальные модели позволили обнаружить влияние первичной адгезии МСК на Фн на остеогенные потенции этих клеток. Следует отметить, что, очевидно, в первую очередь оно обусловлено первоначальным взаимодействием клеточных рецепторов с доменом Фн, связывающимся с клеткой, в момент прикрепления МСК к субстрату. Вопросы о влиянии внеклеточного матрикса на дальнейшую судьбу клеток, а также самих клеток на состав и свойства внеклеточного матрикса заслуживают отдельного исследования, выходящего за рамки задач настоящей работы.

Ослабление остеогенных потенций МСК костного мозга на Фн проявлялось как в снижении спонтанной экспрессии ЩФ в стандартной ростовой среде, так и в более слабой минерализации в присутствии индукторов остеогенеза. Как известно, минерализация костного матрикса происходит при участии ЩФ, так что, возможно, между наблюдаемыми эффектами существует непосредственная связь. Сравнение активности ЩФ и величины отложений кальция на различных фрагментах Фн позволяет заключить, что в обеих ситуациях подавление остеогенеза опосредовано прежде всего доменом, связывающимся с клеткой. Вероятно, в этом процессе задействованы интегрин, о роли которых в регуляции остеогенной дифференцировки неоднократно сообщалось (Gronthos et al., 2001; Docheva et al., 2007; Martino et al., 2009), однако выяснение конкретных механизмов передачи сигнала требуют дополнительных экспериментов.

Остается неясным, имело место блокирование на Фн определенных стадий дифференцировки или замедление ее темпа. Судя по морфологии образующихся в индукционной среде очагов остеогенеза, его ранние этапы на Фн проходили нормально; явные отличия от контроля наблюдались лишь на стадии кальцификации матрикса. Гипотеза о подавлении этого процесса Фн не согласуется с данными о необходимости взаимодействия с ним для образования минерализованных узелков коммитированными остеобластами (Moursi et al., 1996). Можно предполо-



жить, что отмеченные нами различия в остеогенных потенциях клеток на пластике и Фн обусловлены прикреплением к Фн менее зрелых предшественников, еще не коммитированных к остеогенезу и требующих большего времени для его завершения. Однако имеющиеся данные об усилении экспрессии цепей интегринов  $\alpha 5$  и  $\beta 1$  в ходе начальных стадий остеогенной дифференцировки МСК (Martino et al., 2009) противоречат предположению о сниженной адгезивности коммитированных остеогенных клеток к Фн.

Полученные нами данные о подавлении остеогенеза под действием Фн не находят подтверждения в литературе. Так, например, в культурах остеобластов (Moursi et al., 1996) и гладкомышечных клеток сосудов (Ding et al., 2006) он, напротив, усиливает остеогенную дифференцировку. Имеются сообщения о стимулирующем влиянии Фн на остеогенные потенции МСК, однако оно, по-видимому, ограничивается ранними стадиями дифференцировки. В частности, при индукции остеогенеза *in vitro* на гидроксипатитной керамике показано повышение активности ЩФ при покрытии носителя Фн (Sogo et al., 2007), а в монослойной культуре на Фн отмечена усиленная экспрессия гена RUNX-2, являющегося маркером коммитирования к остеогенезу, при сопоставимой с контролем на пластике активности ЩФ (Cool, Nurcombe, 2005). Однако мы не можем непосредственно сопоставлять наши результаты с данными этих работ ввиду несоответствия исследуемых стадий дифференцировки. Возможно, различия в ходе остеогенеза, приводящие к обнаруженному нами ослаблению минерализации матрикса под влиянием первичной адгезии клеток к Фн, возникают лишь на завершающем этапе дифференцировки. Впрочем, в аналогичном исследовании, проведенном на МСК из костного мозга человека, не было выявлено различий в количестве откладываемого кальция при индукции остеогенеза на пластике и Фн (Salasznyk et al., 2004). Причины этого расхождения в результатах не вполне ясны; не исключено, что оно обусловлено неодинаковой видовой принадлежностью использованных клеток.

Проблема влияния Фн на адгезию, рост и дифференцировку МСК имеет не только теоретическое, но и прикладное значение. Имобилизация адгезивных белков на носителях, применяемых для создания тканеинженерных конструкций, рассматривается как перспективный способ улучшения их заселения клетками. При этом белок, используемый для покрытия носителя, должен не только обеспечивать адгезию и пролиферацию клеток, но и не препятствовать их дифференцировке. Обнаруженное нами подавление остеогенеза на Фн поднимает вопрос о применимости этого белка в указанных целях. Впрочем, следует иметь в виду, что ответ клеток на внешние сигналы, в том числе на взаимодействие с внеклеточным матриксом, в значительной мере зависит от пространственной организации и может быть неодинаковым в монослойной культуре и в объеме носителя. Известно, в частности, что в двумерном и трехмерном окружении у клеток неодинаковый уровень экспрессии интегринов и различным образом организованы фокальные контакты (Docheva et al., 2007). Есть данные о том, что в трехмерном окружении как *in vitro* (Sogo et al., 2007), так и *in vivo* (Dennis et al., 1992) Фн не только не подавляет, но и усиливает остеогенную дифференцировку МСК. Анализ зависимости его влияния на МСК от их пространственного окружения представляется перспективной темой для дальнейших исследований.

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

#### Список литературы

- Кожневникова М. Н., Микаелян А. С., Старостин В. И. 2008. Сравнительная иммунофенотипическая и функциональная характеристика мезенхимных стромальных клеток из дефинитивных и транзиторных кроветворных органов. Докл. РАН. 422 (2) : 265—267.
- Пирс Э. 1962. Гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 962 с.
- Стрелков Р. Б. 1999. Таблицы Стрелкова и экспресс-метод статистической обработки данных. М.: ПАИМС. 96 с.
- Фриденштейн А. Я., Чайлахян Р. К., Лялькина К. С. 1970. О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворной ткани морских свинок. Цитология. 12 (9) : 1147—1155.
- Abramoff M. D., Magelhaes P. J., Ram S. J. 2004. Image processing with ImageJ. Biophoton. Int. 11 : 36—42.
- Akimov S. S., Krylov D., Fleischman L. F., Belkin A. M. 2000. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. J. Cell Biol. 148 : 825—838.
- Amenta P. S., Harrison D. 1997. Expression and potential role of the extracellular matrix in hepatic ontogenesis: a review. Microsc. Res. Tech. 39 : 372—386.
- Anker P., in 't, Noort W. A., Scherjon S. A., Kleijburg-van der Keur C., Kruisselbrink A. B., Bezooijen R. L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H., Fibbe W. E. 2003. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. Haematologica. 88 : 845—852.
- Chen X.-D., Dusevich V., Feng J. Q., Manolagas S. C., Jilka R. L. 2007. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. J. Bone Miner. Res. 22 : 1943—1956.
- Cool S. M., Nurcombe V. 2005. Substrate induction of osteogenesis from marrow-derived mesenchymal precursors. Stem Cells Develop. 14 : 632—642.
- Dalton B. A., McFarland C. D., Underwood P. A., Steele J. G. 1995. Role of the heparin binding domain of fibronectin in attachment and spreading of human bone-derived cells. J. Cell Sci. 108 : 2083—2092.
- Dennis J. E., Haynesworth S. E., Young R. G., Caplan A.I. 1992. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. Cell Transplant. 1 : 23—32.
- Ding H.-T., Wang C.-G., Zhang T.-L., Wang K. 2006. Fibronectin enhances *in vitro* vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells via ERK pathway. J. Cell. Biochem. 99 : 1343—1352.
- Djouad F., Delorme B., Maurice M., Bony C., Apparailly F., Louis-Plence P., Canovas F., Charbord P., Noël D., Jorgensen C. 2007. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. Arthritis Res. Ther. 9 : R33.
- Docheva D., Popov C., Mutschler W., Schieker M. 2007. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. J. Cell. Mol. Med. 11 : 21—38.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy. 8 : 315—317.
- Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp. Hematol. 4 : 267—274.
- Fromiguet O., Hamidouche Z., Chateauvieux S., Charbord P., Marie P. J. 2008. Distinct osteoblastic differentiation of murine fe-



tal liver and bone marrow stroma-derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 104 : 620—628.

Götherström C., West A., Liden J., Uzunel M., Lahesmaa R., Le Blanc K. 2005. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica.* 90 : 1017—1026.

Gronthos S., Simmons P. J., Graves S. E., Robey P. G. 2001. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone.* 28 : 174—181.

Guillot P. V., Gotherstrom C., Chan J., Kurata H., Fisk N. M. 2007. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells.* 25 : 646—654.

Jeong J., Han I., Kim J., Park I., Woods A., Couchman J. R., Oh E.-S. 2001. Rat embryo fibroblasts require both cell-binding and the heparin-binding domains of fibronectin for survival. *Biochem. J.* 356 : 531—537.

Kim J., Han I., Kim Y., Kim S., Oh E.-S. 2001. C-terminal heparin-binding domain of fibronectin regulates integrin-mediated cell spreading but not the activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J.* 360 : 239—245.

Lesot H., Fausser J.-L., Akiyama S. K., Staub A., Black D., Kubler M.-D., Ruch J. V. 1992. The carboxy-terminal extension of the collagen binding domain of fibronectin mediates interaction with a 165 kDa membrane protein involved in odontoblast differentiation. *Differentiation.* 49 : 109—118.

Martino M. M., Mochizuki M., Rothenfluh D. A., Rempel S. A., Hubbell J. A., Barker T. H. 2009. Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials.* 30 : 1089—1097.

Moursi A. M., Damsky C. H., Lull J., Zimmerman D., Doty S. B., Aota S.-I., Globus R. K. 1996. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J. Cell Sci.* 109 : 1369—1380.

O'Connor K. C., Song H., Rosenzweig N., Jansen D. A. 2003. Extracellular matrix substrata alter adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cell from human adipose. *Biotech. Lett.* 25 : 1967—1972.

Ogura N., Kawada M., Chang W.-J., Zhang Q., Lee S.-Y., Kondoh T., Abiko Y. 2004. Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin. *J. Oral Sci.* 46 : 207—213.

Peterson J. A., Sheibani N., David G., Garcia-Pardo A., Peters D. M. 2005. Heparin II domain of fibronectin uses  $\alpha 4\beta 1$  integrin to control focal adhesion and stress fiber formation, independent on syndecan-4. *J. Biol. Chem.* 280 : 6915—6922.

Phinney D. G., Kopen G., Isaacson R. L., Prockop D. J. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J. Cell. Biochem.* 72 : 570—585.

Priglinger S. G., Alge C. S., Neubauer A. S., Kristin N., Hirneiss C., Eibl K., Kampik A., Welge-Lüssen U. 2004. TGF- $\beta 2$ -induced cell surface tissue transglutaminase increases adhesion and migration of RPE cells on fibronectin through the gelatin-binding domain. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 : 955—963.

Rüster B., Grace B., Seitz O., Seifried E., Henschler R. 2005. Induction and detection of human mesenchymal stem cell migration in the 48-well reusable transwell assay. *Stem Cells Develop.* 14 : 231—235.

Salasznyk R. M., Williams W. A., Boskey A., Batorsky A., Plopper G. E. 2004. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 1 : 24—34.

Schor S. L., Ellis I., Dolman C., Banyard J., Humphries M. J., Mosher D. F., Grey A. M., Mould A. P., Sottile J., Schor A. M. 1996. Substratum-dependent stimulation of fibroblast migration by the gelatin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Sci.* 109 : 2581—2590.

Silva Meirelles L., da, Chagastelles P. C., Nardi N. B. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119 (Pt 11) : 2204—2213.

Sogo Y., Ito A., Matsuno T., Oyane A., Tamazawa G., Satoh T., Yamazaki A., Uchimura E., Ohno T. 2007. Fibronectin-calcium phosphate composite layer on hydroxyapatite to enhance adhesion, cell spread and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Biomed. Mater.* 2 : 116—123.

Song H., Chang W., Lim S., Seo H.-S., Shim C. Y., Park S., Yoo K.-J., Kim B.-S., Min B.-H., Lee H., Jang Y., Chung N., Hwang K.-C. 2007. Tissue transglutaminase is essential for integrin-mediated survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 25 : 1431—1438.

Van Den Heuvel R., Versele S., Schoeters G., Vanderborgh O. 1987. Stromal stem cells (CFU-f) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice. *Br. J. Haematol.* 66 : 15—20.

Van der Velde-Zimmermann D., Verdaasdonk M. A., Rademakers L. H., De Weger R. A., Van den Tweel J. G., Joling P. 1997. Fibronectin distribution in human bone marrow stroma: matrix assembly and tumor cell adhesion via  $\alpha 5\beta 1$  integrin. *Exp. Cell Res.* 230 : 111—120.

Woods A., Couchman J. R., Johanson S., Höök M. 1986. Adhesion and cytoskeletal organization of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *EMBO J.* 5 : 665—670.

Yamada K. M., Humphries M. J., Hasegawa T., Hasegawa E., Olden K., Chen W.-T., Akiyama S. K. 1986. Fibronectin: molecular approaches to analyzing cell interactions with the extracellular matrix. In: *The cell in contact. Adhesions and junctions as morphogenetic determinants.* New York: John Wiley & Sons. 303—332.

Поступила 6 VI 2009

## INFLUENCE OF PRIMARY ADHESIVE INTERACTIONS WITH FIBRONECTIN ON CLONAL GROWTH AND OSTEOGENIC POTENTIAL OF RAT MESENCHYMAL STROMAL CELLS

O. V. Payushina,<sup>1</sup> O. N. Khnykova, N. N. Butorina, E. I. Bueverova, A. A. Minin, V. I. Starostin

N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow; <sup>1</sup> e-mail: payushina@mail.ru

Interactions with extracellular matrix including fibronectin (Fn) play an important role in regulation of cell growth and differentiation. Influence of Fn and its individual domains on adhesion and osteogenic potencies of rat mesenchymal stromal cells (MSCs) was estimated. Investigation of bone marrow or fetal liver MSCs adhesion dynamics showed that after 7 days of cultivation on Fn the number of adhered clonogenic cells derived from both sources was comparable to their number observed on plastic but their content in suspension was commonly decreased. Population of fetal liver MSCs differed from bone marrow-derived population by greater fraction of cells that adhered for the first 7 days. Bone marrow MSC cultures on Fn were characterized by reduced activity of alkaline phosphatase as compared with cultivation on plastic; furthermore, they deposited significantly smaller amount of calcium salts under cultivation in osteogenic medium. Cultivation of MSCs on Fn fragments demonstrated the primary role of its cell-binding domain in the inhibition of osteogenesis.

Key words: mesenchymal stromal cells, extracellular matrix, fibronectin, adhesion, osteogenesis.