

СКОРОСТЬ МИГРАЦИИ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КРОЛИКА В РАЗНЫХ ГЕЛЯХ И АКТИВНОСТЬ ИХ ММП

© *Н. М. Юдинцева, Н. С. Николаенко, И. В. Воронкина,
Л. В. Смагина, Г. П. Пинаев*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: yudintceva@mail.ru*

В работе исследовали скорость миграции стромальных клеток костного мозга (СККМ) и дермальных фибробластов (ДФ) кролика в коллагеновом и фибриновом гелях. Показано, что в коллагеновом геле активнее мигрируют ДФ, а в фибриновом — СККМ. При исследовании активности матричных металлопротеиназ (ММП), которые в процессе культивирования синтезируются клетками, было установлено, что у клеток обоих типов активность ММП-2 была выше при миграции в коллагеновом геле, а активность ММП-9 — при миграции в фибриновом геле. Различная скорость миграции клеток может быть обусловлена свойствами клеток, активностью синтезируемых ими ММП и влиянием на этот процесс микроокружения клеток (коллагена или фибрина).

Ключевые слова: дермальные фибробласты (ДФ), коллаген, матричные металлопротеиназы (ММП), стромальные клетки костного мозга (СККМ), фибрин.

В процессе заживления небольших и неглубоких повреждений кожи происходит восстановление ее структуры и функций с помощью мигрирующих в зону дефекта фибробластов, а затем эпидермальных клеток. При более значительных повреждениях применяют клеточные продукты, представляющие собой полимерные гели, содержащие СККМ или ДФ. При внесении подобного продукта в рану клетки начинают из него мигрировать и вступать во взаимодействие с собственными клетками организма. Клетки, внесенные в геле, и клетки организма синтезируют белки внеклеточного матрикса (ВКМ), ростовые факторы, цитокины, ремоделируют белки ВКМ с помощью матричных металлопротеиназ (ММП), осуществляя тем самым процесс восстановления после повреждения (Lutolf, Hubbell, 2005).

Миграционные способности клеток оказывают непосредственное влияние на эффективность, характер и скорость регенерации поврежденной ткани (Martin, Parkhurst, 2004). Недостаточная скорость и интенсивность миграции клеток могут приводить к плохой васкуляризации ткани и в результате к некрозу (Phelps, Garcia, 2010), поэтому при использовании трансплантируемого материала важно представлять, какие условия необходимы для эффективной миграции внесенных клеток. Скорость миграции может зависеть от свойств клеток, от того микроокружения, в котором они находятся, а также от активности ММП, синтезируемых внесенными клетками и реорганизующих структуру окружающего ВКМ.

В последние годы много исследований было посвящено изучению ММП как ключевых протеиназ в ремоделировании ВКМ, в процессах инвазии (миграции), морфогенеза при развитии организма или при патофизиологических условиях (Nagase, Woessner, 1999; Nabeshima et al., 2002; Friedl, 2004). Кроме того, известно, что при миграции в трехмерных конструкциях клетки секретируют активированные ММП, осуществляя, таким образом, реорганизацию ВКМ (Cukierman et al., 2001; Shreiber et al., 2003) и движение внутри геля (Zaman et al., 2007; Friedl, Wolf, 2010).

ММП принимают участие на различных этапах деградации коллагена и других белков ВКМ. Среди них особую роль играет ММП-1 (коллагеназа-1), которая путем гидролиза осуществляет первичную деградацию молекул коллагена, после чего происходит их дальнейшее расщепление под действием ММП, обладающих желатинолитической активностью (Pepper, 2001). Такими ММП являются желатиназа А (ММП-2) и желатиназа В (ММП-9) с мол. массами 72 и 92 кДа соответственно. Данные желатиназы участвуют в ремоделировании мажорных белков ВКМ — коллагена, ламинина, фибронектина и эластина (Pucci-Minafra et al., 2001; Ratzinger, 2002). Кроме того, ММП-2 принимает участие в регуляции трансэндотелиальной миграции СККМ, и блокирование ее активности приводит к значительному снижению миграции клеток (Becker et al., 2007).

Целью работы было сравнить скорость миграции клеток в коллагеновом и фибриновом гелях с помощью оценки площади, занимаемой мигрирующими клетками, и влияние микроокружения на процесс миграции. Кроме того, анализировали активность ММП, синтезируемых клетками в процессе их миграции в гелях.

Материал и методика

Реактивы. Питательные среды: α MEM (Sigma, США), DMEM (ICN, США); эмбриональная сыворотка коров (Gibco, США), фибриноген (Calbiochem, США), смесь пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, Великобритания), гистопак и тромбин (Sigma, США).

Выделение и культивирование дермальных фибробластов. Использовали клетки новорожденных кроликов породы шиншилла. Согласно правилам работы с лабораторными животными применяли стандартные препараты для премедикации и наркоза. Для выделения клеток животных умерщвляли путем растяжения позвоночника, стерилизовали в 30%-ном этиловом спирте в течение 10 мин. Фибробласты кролика выделяли методом миграции из фрагментов кожи. Кожу промывали буферным раствором PBS (137 мМ NaCl, 7 мМ Na_2HPO_4 , 1.5 М KH_2PO_4 и 267 мМ KCl, pH 7.4) и нарезали на небольшие фрагменты. Кусочки кожи размещали по центру чашки Петри (Nunc, Дания), накрывали сверху стерильным покровным стеклом и добавляли среду DMEM (ICN, США), содержащую 18 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и смесь пенициллина и стрептомицина при рабочей концентрации (100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно). Миграция клеток из кусочков кожи начиналась через 3 сут, через 10—14 сут на дне чашки Петри фибробласты образовывали монослой. В работе использовали клетки 2—4-го пассажей.

Выделение и культивирование СККМ. Из новорожденного кролика извлекали плоские кости таза и помещали их в раствор PBS, содержащий смесь антибиотиков. С костей удаляли мягкие ткани, кости рассекали скальпелем и раствором PBS при помощи шприца с иглой 23G вымывали костный мозг. Ядросодержащие клетки костного мозга выделяли согласно модифицированному методу (Pittenger et al., 2001; Николаенко, 2008).

Для этого костный мозг суспендировали в растворе PBS, суспензию наслаивали на раствор гистопака с плотностью 1.077 г/мл и центрифугировали в режиме 800 g 20 мин при комнатной температуре. Клетки, находящиеся в интерфазном слое гистопака (в основном ядросодержащие клетки), переносили в другую пробирку и центрифугировали в 10 объемах раствора PBS для очистки от гистопака. Отмытые клетки суспендировали в среде α MEM (Sigma, США), содержащей 10 % сыворотки эмбрионов коров (Gibco, США) и раствор антибиотиков. Подсчет ядросодержащих клеток проводили под инвертированным микроскопом, используя счетчик форменных элементов крови. Клетки высевали в чашки Петри с концентрацией 10^6 кл./см² и помещали в инкубатор с 5 %-ным содержанием CO_2 при 37 °С. В экспериментах использовали клетки 2—4-го пассажей.

Приготовление коллагенового и фибринового гелей. Для приготовления коллагенового геля использовали коллаген I типа, полученный из сухожилий крысиных хвостов по стандартной методике (Chandrakasan et al., 1967; Кухарева и др., 2008). Подводили значение pH охлажденного раствора коллагена до нейтрального с помощью 0.34 N раствора NaOH. Затем в раствор коллагена в соотношении 1 : 1 добавляли среду α MEM (Sigma, США), содержащую 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и смесь антибиотиков.

Для приготовления фибринового геля использовали коммерческий препарат фибриноген (Calbiochem, США), выделенный из плазмы крови человека. В раствор фибри-

ногена в соотношении 1 : 1 добавляли среду α MEM (Sigma, США), содержащую 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и смесь антибиотиков. Затем в полученный раствор вводили тромбин (Sigma, США) при концентрации 1 ед./мл, благодаря чему происходили полимеризация фибриногена и образование фибринового геля.

Для того чтобы выяснить, мигрируют ли клетки по направлению ко дну лунки, в каждую лунку 24-луночной платы были помещены покровные стекла (Menzel, США) с диаметром, соответствующим диаметру лунки. Затем аликвоты коллагенового и фибринового гелей объемом 500 мкл вносили в лунки, гели инкубировали в атмосфере 5%-ного CO_2 при 37 °С до их полной полимеризации. Конечная концентрация коллагенового и фибринового гелей составляла 2 мг/мл.

Инъецирование клеток в гели. В центр каждой лунки с гелем на глубину около 1 мм инъецировали 3 мкл суспензии СККМ или ДФ при концентрации $2 \cdot 10^4$ клеток на 1 лунку, стараясь максимально стандартизировать этот процесс. Через 60 мин на гель наслаивали 1 мл среды α MEM (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров и антибиотики. Число лунок в каждом варианте введения клеток в гели составляло 12. Гели с инъецированными в них клетками культивировали в течение 2 сут. Были проведены 3 независимых эксперимента.

Измерение площади миграции клеток. Скорость миграции клеток в гелях оценивали путем измерения площади миграции клеток по поверхности гелей. После введения клеток в лунки с гелем делали фотографии лунок при увеличении объектива 10 \times . Фотографировали в течение первых 2 сут начиная с момента инъециции клеток в гели. На полученных фотографиях измеряли площадь миграции клеток с помощью программы Image J (свободный доступ, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Исходную площадь инъециции принимали за 100 %, последующие 2 сут миграции клеток соответствовали приросту площади по отношению к исходному значению.

Выявление активности ММП методом зимографии и гели. Активность ферментов у клеток, инъецированных в гели, определяли методом зимографии. Так как нас интересовали протеазы, которые могут фрагментировать основные белки ВКМ, в качестве субстрата для выявления активности ММП был выбран желатин. Анализировали образцы среды, кондиционированной ДФ и СККМ через 1 и 2 сут культивирования. В качестве контроля использовали среду для культивирования клеток α MEM (Sigma, США), содержащую 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и раствор антибиотиков.

Экспериментальные образцы растворяли в буфере для проб (0.625 М Трис-HCl, pH 6.8, 2%-ный SDS, 10%-ный глицерин и 0.01%-ный бромфеноловый синий) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Белки разделяли в 4—5%-ном разделяющем и 10%-ном центрирующем полиакриламидном гелях в денатурирующих условиях в присутствии 10%-ного SDS в Трис-глицериновом буфере Лэммли (Laemmli, 1970) при значении тока 25 мА. Вместо воды при приготовлении гелей использовали раствор желатина (40 мг на 12 мл воды).

Для выявления положения зон, соответствующих ММП-2 и ММП-9, использовали среду, кондиционированную фибробластами линии HT-1080, которая содержит латентные и активные формы ММП-2 и ММП-9 (Oli-ver et al., 1999).

После проведения электрофореза гель 2 раза по 15 мин отмывали 0.5 %-ным раствором Тритона X-100 и выдерживали в течение ночи для выявления активности ферментов в растворе (50 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 5 мМ CaCl₂). Гель окрашивали раствором Кумасси и отмывали в 7 %-ном растворе уксусной кислоты. Изображения, полученные в электронном виде, анализировали с помощью программы Image J. Степень активности ММП для выявленных полос выражали в усл. ед. (произведение площади окрашенной полосы в пикселях и интенсивности окраски в единицах оптического поглощения).

Математическая обработка. Обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel, определяя следующие показатели: среднее значение, стандартное отклонение, ошибку среднего, доверительный интервал (P); различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Результаты

Вид капли СККМ и ДФ, инъецированных в коллагеновый и фибриновый гели, показан на рис. 1, *а, б*. В течение 1—2 сут в обоих вариантах гелей миграция клеток происходила по поверхности геля в радиальном направлении (рис. 1, *в—е*). Через 1 сут миграции в фибриновом геле на дне лунок были обнаружены СККМ (рис. 2). В других вариантах миграции клеток на дне лунок не обнаружено.

Показателем скорости миграции является площадь, занимаемая клетками в определенный момент времени. Скорость миграции ДФ и СККМ в гелях была различной. В коллагеновом геле ДФ мигрировали активнее, чем СККМ. Через 1 и 2 сут культивирования площадь, занимаемая ДФ, была соответственно на 10 и 20 % больше, чем площадь, занимаемая СККМ (рис. 3, *а*). Напротив, в фибриновом геле более активно мигрировали СККМ. Через 1 и 2 сут культивирования площадь их миграции была соответственно на 25 и 10 % больше, чем площадь миграции ДФ (рис. 3, *б*). Таким образом, в коллагеновом геле активнее мигрировали ДФ, а в фибриновом — СККМ.

Известно, что одними из основных участников реорганизации окружающего и синтезируемого клетками матрикса являются ММП, которые в процессе миграции клеток осуществляют фрагментирование коллагена, в результате чего образуется денатурированный коллаген — желатин (Repper, 2001). В связи с этим в среде, кондиционированной клетками, анализировали активность ММП, обладающих желатинолитической активностью: желатиназы А (ММП-2) и желатиназы В (ММП-9) с мол. массаами 72 и 92 кДа соответственно (рис. 4).

В обоих вариантах гелей через 1 сут культивирования активность ММП-2 у СККМ была незначительно выше, чем у ДФ. Однако через 2 сут культивирования профиль активности ММП изменялся: активность ММП-2 у ДФ значительно возрастала и становилась выше, чем у СККМ (рис. 5, *а, б*). Активность ММП-9 при миграции клеток в коллагеновом геле у ДФ была на 20 % выше, чем

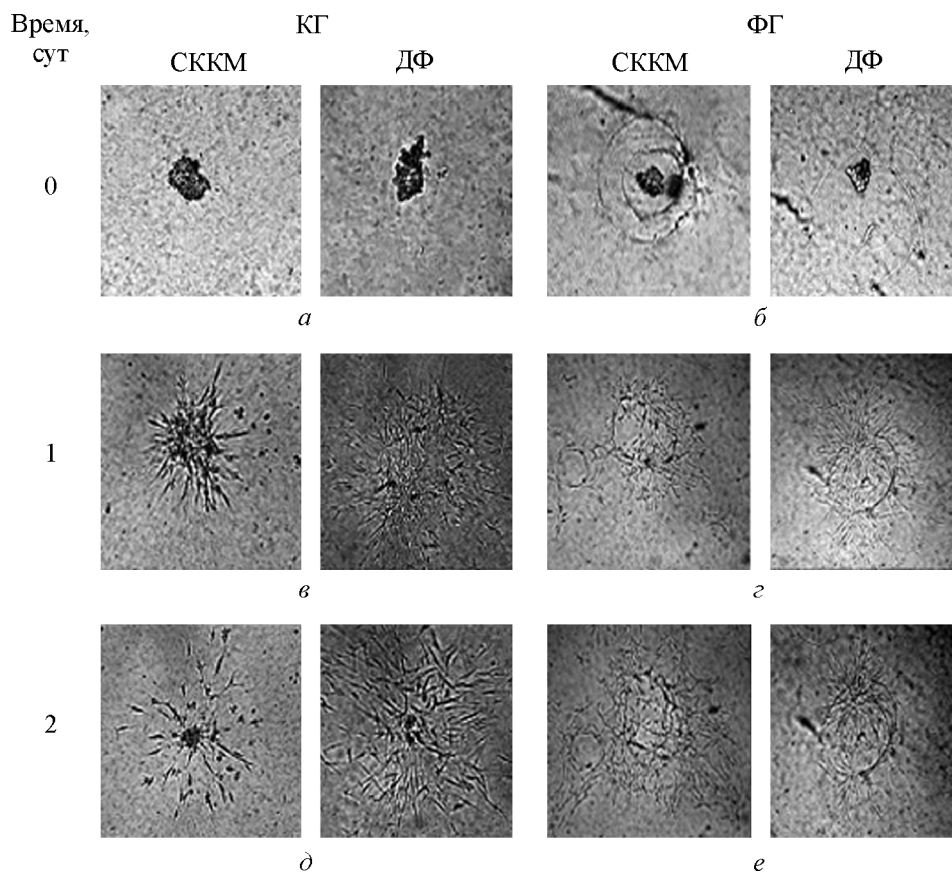


Рис. 1. Миграция клеток в разных гелях.

а, б — инъекция суспензии стромальных клеток костного мозга (СККМ) и дермальных фибробластов (ДФ) в коллагеновом (КГ) и фибриновом (ФГ) гелях соответственно; *в, г* — через 1 сут миграции; *д, е* — через 2 сут миграции. Об. 10×.

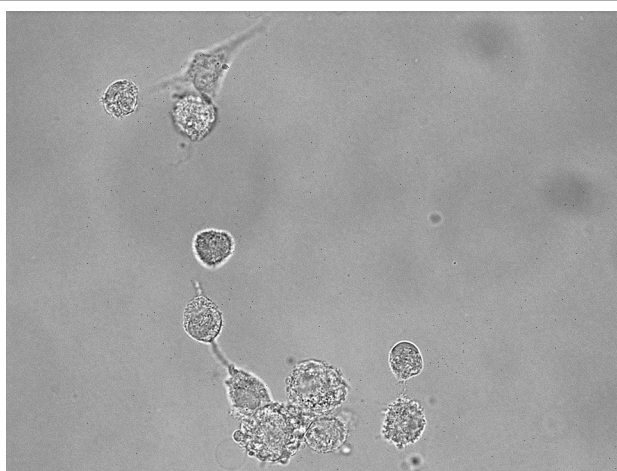


Рис. 2. СККМ, мигрировавшие из ФГ на дно лунки через 1 сут культивирования. Об. 40х.

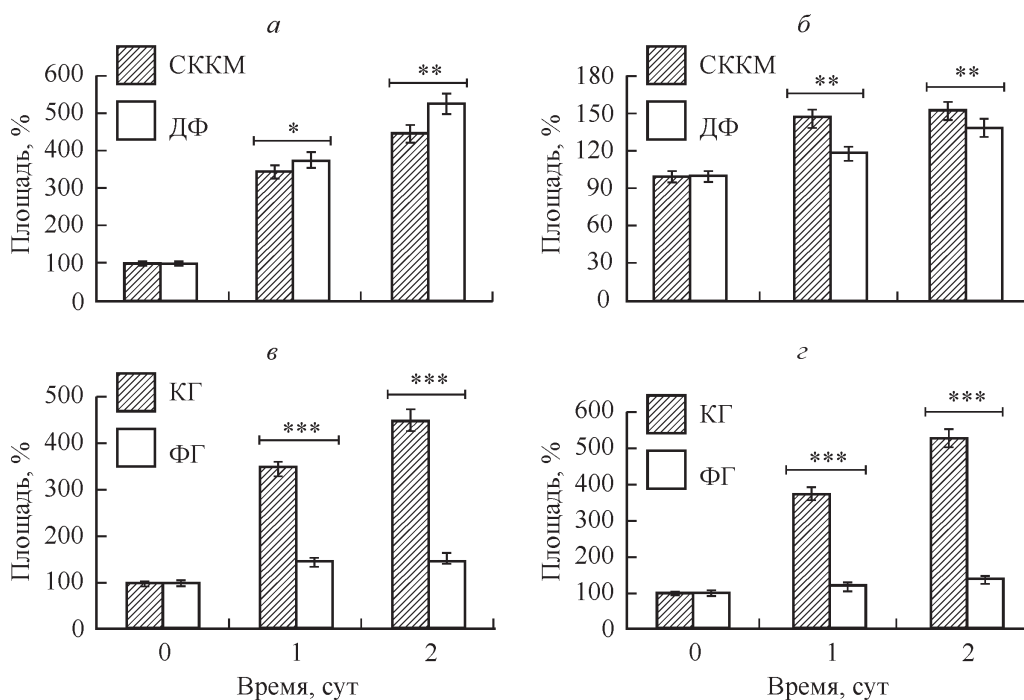


Рис. 3. Сравнение площадей миграции СККМ ДФ.

а, б — в КГ и ФГ соответственно; в — СККМ в разных гелях; г — ДФ в разных гелях. За 100 % принимали площадь, занимаемую суспензией клеток сразу после инъекции (точка «0»). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

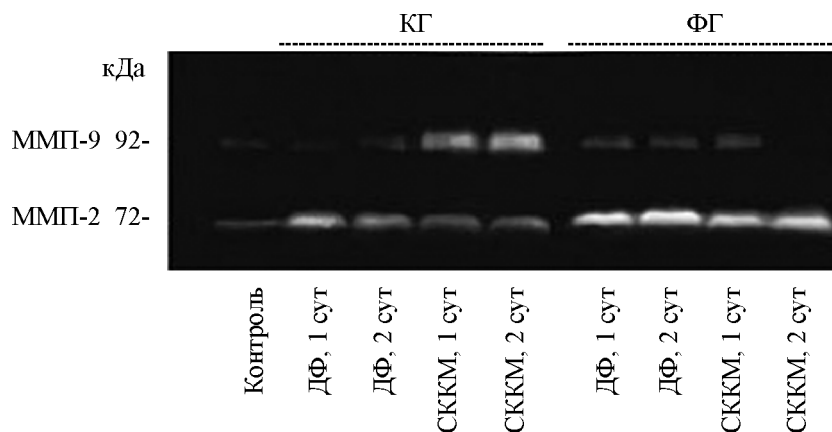


Рис. 4. Активность ММП-2 и ММП-9 в среде, кондиционированной СККМ и ДФ, через 1 и 2 сут миграции в КГ и ФГ. Данные зимографии. Выявляется активная форма ММП. Контроль — среда α MEM, содержащая 10 % эмбриональной сыворотки коров и раствор антибиотиков.

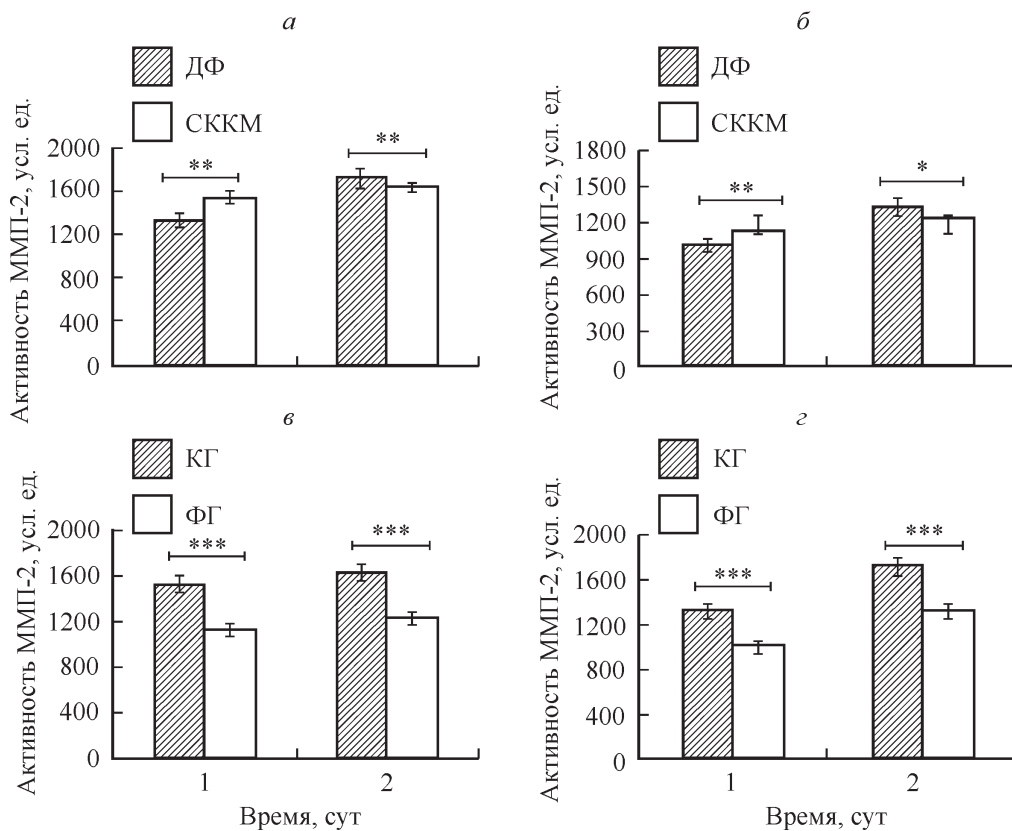


Рис. 5. Сравнительная количественная оценка активности ММП-2 в среде, кондиционированной СККМ и ДФ, при их миграции в гелях.

a, б — в КГ и ФГ соответственно; *в* — СККМ в разных гелях; *г* — ДФ в разных гелях. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

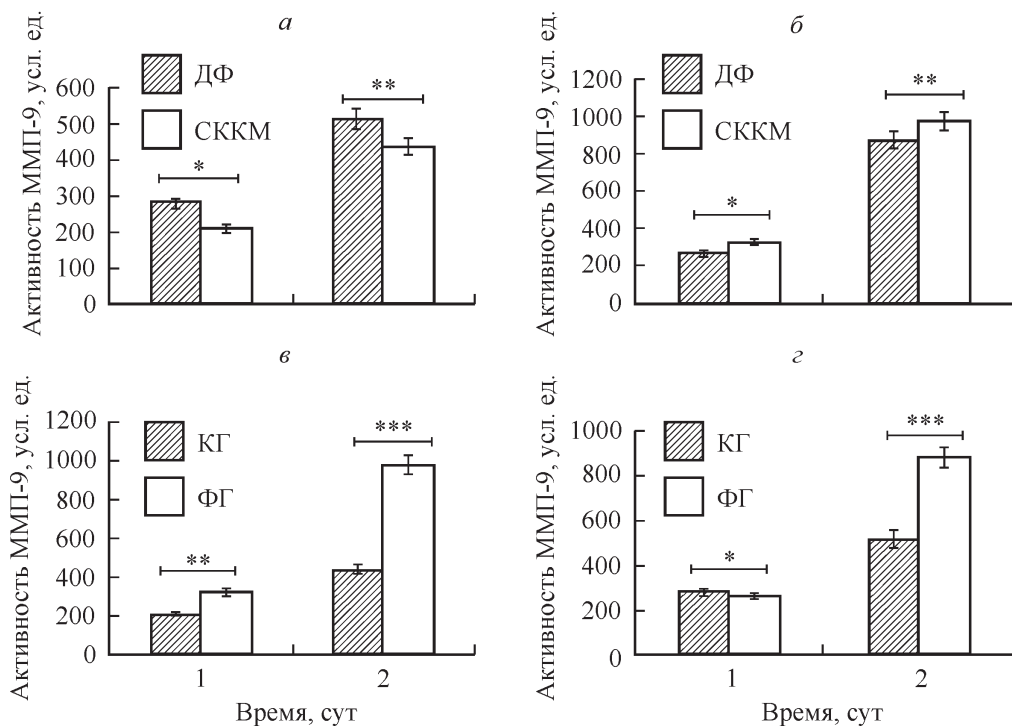


Рис. 6. Сравнительная оценка активности ММП-9 в среде, кондиционированной СККМ и ДФ, при их миграции в гелях.

a, б — в КГ и ФГ соответственно; *в* — СККМ в разных гелях; *г* — ДФ в разных гелях. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

у СККМ (рис. 6, а). Напротив, в фибриновом геле активность ММП-9 у СККМ была на 15 % больше, чем у ДФ (рис. 6, б).

Полученные результаты демонстрируют, что микроокружение (коллаген или фибрин) оказывает существенное влияние на скорость миграции клеток. Площадь миграции обоих типов клеток в коллагеновом геле была в 3 раза больше, чем в фибриновом геле (рис. 3, в, з). Кроме того, влияние микроокружения проявлялось и в различной степени активности ММП, синтезируемых клетками. Активность ММП-2 была выше в коллагеновом геле по сравнению с фибриновым гелем (рис. 5, в, з). Напротив, активность ММП-9 была выше в фибриновом геле по сравнению с коллагеновым гелем (рис. 6, в, з).

Обсуждение

Скорость миграции клеток по поверхности и внутри геля, а также процесс его ремоделирования могут зависеть как от свойств клеток, так и от свойств геля. В проведенном исследовании показано, что СККМ и ДФ при одинаковых условиях культивирования (в одном и том же геле) мигрировали с разной скоростью и имели различия в активности ММП.

Так как движение клеток через матрикс осуществляется путем реорганизации белков ВКМ с помощью ММП (Friedl et al., 1998; Shapiro, 1998; Papadimitriou et al., 2001; Whatling et al., 2004), можно предполагать, что повышенная активность ММП-2 у ДФ свидетельствует о более активном ремоделировании обоих вариантов гелей по сравнению с СККМ.

Помимо самих свойств клеток на скорость их миграции в гелях оказывают влияние физические и биохимические характеристики микроокружения. Большая площадь миграции клеток в коллагеновом геле, чем в фибриновом, вероятно, может быть связана с различным характером миграции клеток. Несмотря на различия в скорости, оба типа клеток в коллагеновом геле мигрировали по поверхности геля в радиальном направлении и не были обнаружены на дне лунок. В фибриновом геле миграция СККМ происходила не только по поверхности геля, но и по направлению на дно лунки. Возможно, что в фибриновом геле ДФ также мигрировали по направлению на дно лунки, но не были там обнаружены через 1 и 2 сут в связи с меньшей, чем у СККМ, скоростью миграции.

Полученные результаты позволяют предполагать, что микроокружение оказывает влияние на активность синтезируемых клетками ММП. Известно, что помимо расщепления белков ВКМ одна из функций ММП-9 в организме — очищение раны от некротических тканей. Таким образом, более высокая активность ММП-9 у обоих типов клеток в фибриновом геле по сравнению с коллагеновым может свидетельствовать о повышенной реакции обоих типов клеток на окружающий их фибрин.

При анализе миграции клеток в трехмерных конструкциях следует учитывать то, что на этот процесс могут влиять и другие факторы, например цитокины или ростовые факторы. Кроме того, известно, что миграционное поведение клеток может зависеть от исходного расстояния между соседними клетками. Редко посеянные клетки мигрируют быстрее и на более длинные дистанции, тогда как их продвижение снижается при увеличении клеточной плотности. Это связано с тем, что единичные клетки внутри геля мигрируют до тех пор, пока не встречаются с

соседними клетками. Немедленно после этого они формируют клеточные контакты, которые снижают скорость последующей миграции. Этот феномен был описан при двухмерном культивировании как контактное ингибирование миграции и двигательной активности (Huttenlocher et al., 1998).

Кроме того, с увеличением плотности клеток и продолжительности времени миграции возможно появление субстратной контаминации интегринами фрагментами, которые блокируют сайты адгезии, и тем самым последующей миграции (Raeber et al., 2007). Согласно существующей гипотезе, при миграции в коллагеновом геле некоторые ММП, синтезируемые клетками, могут играть важную роль в откреплении белков и адгезионных комплексов от субстрата (Prajapati et al., 2000).

Таким образом, в работе выявлены различия между СККМ и ДФ по скорости их миграции при культивировании в одних и тех же условиях. Показано, что скорость миграции клеток может быть связана с индивидуальными свойствами клеток, активностью синтезируемых ими ММП и с влиянием на этот процесс микроокружения.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 гг.» (государственный контракт № 02.522.11.2006/3) и государственного контракта № К-32-НИР/111-3 от 24 октября 2011 г. на выполнение научно-исследовательской работы в рамках программы Союзного государства «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток».

Список литературы

- Кухарева Л. В., Блинова М. И. 2008. Растворимый коллаген и его применение в тканевой инженерии и медицине. Информ. бюл. Клеточные культуры. 23 : 43—52.
- Николаенко Н. С. 2008. Стволовые клетки взрослого организма в культуре. В кн.: Методы культивирования клеток. СПб.: Изд-во Политех. ун-та. 188—201.
- Becker A. D., Hummelen P. V., Bakkus M., Vande Broek I., De Wever J., De Waele M., Van Riet I. 2007. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. Haematologica. 92 : 440—449.
- 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.
- Cukierman E., Pankov R., Stevens D. R., Yamada K. M. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science. 294 : 1708—1712.
- Friedl P. 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. Curr. Opin. Cell Biol. 16 : 14—23.
- Friedl P., Wolf K. 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. J. Cell Biol. 188 : 11—19.
- Friedl P., Zanker K. S., Bröcker E. B. 1998. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. Microsc. Res. Tech. 43 : 369—378.
- Huttenlocher A., Lakonishok M., Kinder M., Wu S., Truong T., Knudsen K. A. 1998. Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity. J. Cell Biol. 14 : 515—526.

- Laemmli U. K.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Lutolf M. P., Hubbell J. A.* 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 23 : 47—55.
- Martin P., Parkhurst S. M.* 2004. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development*. 131 : 3021—3034.
- Nabeshima K., Inoue T., Shimao Y., Sameshima T.* 2002. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol. Int.* 52 : 255—264.
- Nagase H., Woessner J.* 1999. Minireview. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274 : 21 491—21 494.
- Oliver G. W., Steller-Stevenson W. G., Kleiner D. E.* 1999. Zymography, casein zymography, and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. Barret A. J., Rawling N. D., Woessner J. F. (eds). San Diego: Acad. Press. 61—76.
- Papadimitriou E., Waters C. R., Manolopoulos V. G., Unsworth B. R., Maragoudakis M. E., Lelkes P. L.* 2001. Regulation of extracellular matrix remodeling and MMP-2 activation in cultured rat adrenal medullary endothelial cells. *Endothelium*. 8 : 181—194.
- Pepper M. S.* 2001. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator—plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 : 1104—1117.
- Pittenger M. F., Mbalaviele G., Black M., Moska J. D., Marshak D. R.* 2001. Mesenchymal stem cells. In: *Human cell culture*. Kluwer Acad. Publ. 5 : 189—207.
- Phelps E. A., Garcí'a A. J.* 2010. Engineering more than a cell: vascularization strategies in tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 : 704—709.
- Prajapati R. T., Chavally-Mis B., Herbage D., Eastwood M., Brown R. A.* 2000. Mechanical loading regulates protease production by fibroblasts in three-dimensional collagen substrates. *Wound Repair Regen.* 8 : 226—237.
- Pucci-Minafra I., Minafra S., La Rocca G., Barranca M., Fontana S., Alaimo G., Okada Y.* 2001. Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis. *Matrix Biol.* 20 : 419—427.
- Raeber G. P., Lutolf M. P., Hubbell J. A.* 2007. Mechanisms of 3-D migration and matrix remodeling of fibroblasts within artificial ECMs. *Acta Biomaterialia*. 3 : 615—629.
- Ratzinger G., Stoitzner P., Ebner S., Lutz M. B., Layton G. T., Rainer C., Senior R. M., Shipley J. M., Fritsch P., Schuler G., Romani N.* 2002. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary dendritic cells from human and murine skin for the migration of Langerhans cells and dermal. *J. Immunol.* 168 : 4361—4371.
- Shapiro S. D.* 1998. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 : 602—608.
- Shreiber D. I., Barocas V. H., Tranquillo R. T.* 2003. Temporal variations in cell migration and traction during fibroblast-mediated gel compaction. *Biophys. J.* 84 : 4102—4114.
- Whatling C., McPheat W., Hurt-Camejo E.* 2004. Matrix management: assigning different roles for MMP-2 and MMP-9 in vascular remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 : 10—11.
- Zaman M. H., Matsudaira P., Lauffenburger D. A.* 2007. Understanding effects of matrix protease and matrix organization on directional persistence and translational speed in three-dimensional cell migration. *Ann. Biomed. Eng.* 35 : 91—100.

Поступила 22 II 2013

MIGRATION RATE OF RABBIT BONE MARROW STROMAL CELLS
AND RABBIT DERMAL FIBROBLASTS IN DIFFERENT GELS AND ACTIVITY OF THEIR MMPs

N. M. Yudin'tseva, N. S. Nikolaenko, I. V. Voronkina, L. V. Smagina, G. P. Pinaev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: yudin'tseva@mail.ru

This paper presents the results of the study of rabbit bone marrow stromal cells (BMSC) and rabbit dermal fibroblasts (DF) migration rates to collagen type I and fibrin gels. It has been shown that DF exhibit greater migration activity in collagen gel, whereas BMSC show a higher migration activity in fibrin gels. By studying the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) synthesized by cells during cultivation in gels, it has been found for both cell types that the activity of MMP-9 is increased in fibrin gels and activity of MMP-2 is increased in collagen gels. Different speed of the migration of cells may be due to the properties of the cells, the activity of MMP synthesized by the cells and the influence of the microenvironment (collagen or fibrin) on the process of synthesis.

Key words: collagen type I, fibrin, dermal fibroblasts (DFs), matrix metalloproteinases (MMPs), bone marrow stromal cells (BMSCs).