

ВЛИЯНИЕ КОЛЛАГЕНА I ТИПА И ФИБРОНЕКТИНА НА МОРФОЛОГИЮ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК СТРОМЫ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ

© Ю. П. Петров,¹ Л. В. Кухарева, Т. А. Крылова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: *yure3ov@mail.ru*

Успешное использование стволовых клеток в прикладной медицине в значительной степени лимитируется, по-видимому, недостатком знаний о поведении этих клеток в культуре. Чтобы отчасти заполнить этот пробел, исследовали взаимодействие мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека с различными подложками (пластик, коллаген I типа, фибронектин и их смеси в различных соотношениях) через 16—18 ч после посева. Для оценки морфологии клеток использовали такие параметры, как площадь и периметр клетки, коэффициенты расплывания и поляризации. Показано, что МСК специфично реагируют на подложку и по исследованным параметрам могут быть разделены на несколько групп. Выявлено разнонаправленное влияние коллагена I типа и фибронектина на расплывание клеток. Коллаген предпочтительно детерминирует поляризацию клеток, тогда как фибронектин способствует их равномерному расплыванию. Действие смеси фибронектина и коллагена на клетки неаддитивное. Предполагается, что варьирование соотношения этих белков в составе внеклеточного матрикса может быть одним из инструментов влияния на морфологию стволовых клеток при их индуцированной дифференцировке.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс (ВКМ), площадь клетки, соотношение белков ВКМ, коэффициент расплывания, коэффициент поляризации.

В последние 10—15 лет появилось значительное количество работ, касающихся возможности использования стволовых клеток в прикладной медицине (Park et al., 2008; Abdelwahid et al., 2011; Vaccarino et al., 2011). Нет сомнения в том, что продолжающийся рост таких патологий, как травмы, сердечно-сосудистые заболевания и опухоли, требует принципиально новых и надежных методов лечения. Несколько лет назад заместительная терапия с использованием стволовых клеток казалась тем самым методом, который из-за относительной простоты и прогнозируемой эффективности будет легко внедрен в практическую медицину (Daley et al., 2003; Filip et al., 2005; Mimeault, Baltra, 2006; Saha, Ferro, 2006). Однако до сих пор нет никаких убедительных данных о том, что эти прогнозы оправдываются (Magnus et al., 2008; Shi, 2009; Ansboro et al., 2012).

Мы считаем, что одной из важных причин отсутствия ожидаемых положительных результатов в использовании стволовых клеток в клинике является недостаточное внимание к изучению их поведения *in vitro*. Это важно, поскольку перевод стволовых клеток в культуру во многих случаях является необходимой процедурой подготовки этих клеток к использованию в клинической медицине. Одно из уникальных свойств стволовых клеток — их способность к дифференцировке в культуре, причем как к спонтанной, так и индуцированной. Однако «индуцированной» еще не означает «управляемой». Чтобы этому научиться, следует выяснить, каковы естественные прин-

ципы контроля дифференцировки клеток в культуре. Одним из самых важных факторов, влияющих на поведение клеток (включая стволовые), является внеклеточный матрикс (ВКМ) (Streuli, Bissell, 1990; Huang, Li, 2011). Однако знание этого факта еще недостаточно для целевого, направленного воздействия на клетки. Для этого необходимо выяснить зависимости (закономерности) влияния ВКМ на поведение клеток.

У многоклеточных ВКМ, продуцируемый клетками, преимущественно фибробластами (Rhee, Grinnell, 2007), сам активно взаимодействует со всеми клетками организма. Это способствует как формированию тканей, так и их нормальному функционированию (Teti, 1992; Daley et al., 2008). Следовательно, для адекватного моделирования процессов, имеющих место в организме, важно исследовать реакцию не отдельных клеток, а всей популяции в целом. Кроме этого, разумно выполнять эксперименты на первичных клеточных культурах с заведомо гетерогенным клеточным составом. Такими свойствами, как нам кажется, обладают мезенхимные стромальные клетки человека (МСК) (Colter et al., 2000; Hung et al., 2002; Chamberlain et al., 2007; Kolf et al., 2007; Augello et al., 2010; Zhang et al., 2012). Поэтому мы выбрали их в качестве объекта исследования.

Известно, что ВКМ в организме тканеспецифичен, несмотря на то что его мажорные компоненты одни и те же во всех тканях. Из этого следует, что активно влиять на клетки, в частности на их морфологию, можно, по-ви-

димому, изменением соотношения мажорных белков ВКМ. Опираясь на это предположение, была сформулирована задача настоящей работы: найти экспериментальные подтверждения взаимосвязи между количественным составом белков ВКМ и морфологией клеток в культуре. В качестве имитатора ВКМ были использованы коллаген I типа и фибронектин как основные белковые компоненты мезенхимных тканей.

Материал и методика

МСК выделяли из костного мозга эмбрионов человека (5—6 нед развития). Клетки культивировали на среде DMEM/F12, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров. В качестве субстрата использовали фибронектин (Sigma Chemical Co., США) и коллаген I типа, полученный из сухожилий крысиных хвостов, как описано (Chandrasekaran et al., 1967). В базовых опытах на поверхность чашек Петри (35 мм; Nunc, Дания) наносили постоянное количество коллагена I типа по 0.5 мг на 1 чашку. В вариантах без коллагена количество фибронектина на 1 чашку составляло 50 мг. В выборках с коллагеном количество фибронектина ранжировали — 10, 30, 50, 100 и 200 мг на 1 чашку. В дополнительных экспериментах в каждую чашку вносили по 50 мг фибронектина. В вариантах без фибронектина количество коллагена также составляло 50 мг на 1 чашку. В экспериментах с фибронектином использовали следующие концентрации коллагена — 10, 50, 100, 500 и 1000 мг на 1 чашку. Растворы белков тщательно перемешивали и равномерно наносили на всю поверхность дна чашки. Затем чашки выдерживали в течение 1 ч при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂, дважды промывали PBS (без кальция и магния), после чего на них сеяли клетки 5—6-го пассажей. Клетки культивировали в течение 16—18 ч в атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °C. После этого их без отделения от подложки трижды промывали PBS, потом ополаскивали дистиллированной водой, фиксировали этанолом и окрашивали красителем Гимза. Для наблюдения и фотографирования клеток использовали обычный световой микроскоп (ЛОМО, Санкт-Петербург) с объективом 10×, оснащенный фотонасадкой Samsung 1050 с разрешением 10 мегапикселей, оптическим зумом 5× (Samsung Techwin Co., Ltd, Корея). Количественный анализ изображений клеток выполняли с использованием программы ImageJ (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

Измеряли площадь (Area) проекции клетки на подложку (далее площадь клетки), ее периметр (Perimeter), коэффициент распластывания (Rp/Ra) и коэффициент поляризации (M/m). Первые два параметра рассчитывали автоматически плагинами ImageJ. Коэффициент распластывания клетки вычисляли, как было предложено нами ранее (Kuz'minykh, Petrov, 2004). Он характеризует степень распластывания клетки и представляет собой отношение радиусов, рассчитанных из известных периметра (Rp) и площади (Ra) данной клетки. Очевидно, что Rp/Ra не может быть меньше 1. Если он равен 1, то клетка имеет правильную форму круга. Чем больше величина этого параметра, тем сильнее клетка распластана. Однако по этому параметру нельзя отличить, например, клетки звездчатые от вытянутых. Здесь мы вводим дополнительный параметр — коэффициент поляризации как отношение осей эллипса (M/m). Программа ImageJ автоматически может

представлять клетку как эллипс и соответственно рассчитывает его большую (M) и малую (m) оси. По их соотношению в первом приближении можно судить о степени поляризации клетки. Так же как и в случае Rp/Ra, величина коэффициента M/m изменяется от 1 (клетка округлая) до больших значений. Высокое значение M/m говорит о выраженной поляризации (вытянутости) клетки.

В каждом эксперименте использовали от 1 до 3 чашек Петри, а число анализируемых клеток на 1 чашку составляло 1000—2000. Поскольку при анализе важны не абсолютные значения, а относительные, величины площади и периметра клеток были оставлены в пикселях. Расчет статистических параметров и кривых регрессии выполнен с помощью пакета анализа Excel 2007 (Microsoft Corporation, США) и программы Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США).

Результаты

Поскольку нам неизвестны работы с аналогично поставленной задачей, постольку выбор белков ВКМ и соотношение используемых концентраций были сделаны нами произвольно. Мезенхимные клетки весьма гетерогенны по своей морфологии. Это хорошо для исследования клеточной популяции в целом, но требует увеличения выборки при их морфометрическом анализе. Большая выборка необходима еще и потому, что при изучении этих популяций мы использовали параметры, величина которых сама по себе зависима от очень большого числа различных факторов. Мы полагаем, что физиологическая регуляция поведения клеток происходит при небольших флюктуациях соотношения мажорных белков ВКМ. Следовательно, и ответ клеток на эти флюктуации не должен быть резко выраженным. Поэтому для его успешной регистрации с привлечением статистических методов требуется достаточно большая выборка клеток.

Данные, представленные на рис. 1, показывают, как изменяются морфологические параметры клеток при их взаимодействии с подложками, покрытыми коллагеном I типа или фибронектином, по сравнению с пластиковой подложкой. Средние значения площади, периметра и коэффициента распластывания клеток выше ($P < 0.001$) при использовании коллагена и фибронектина (рис. 1, а, б). При этом влияние фибронектина на клетки выражено больше, чем у коллагена. Тем не менее количественные различия в степени распластывания клеток при использовании этих параметров не говорят о степени поляризации клеток при их распластывании на исследуемых белках. Поэтому мы ввели дополнительный параметр — коэффициент поляризации, один из вариантов которого был предложен еще в работе Черепановой и соавторов (Черепанова et al., 2006). Результат на рис. 1, в указывает на принципиально иное влияние фибронектина на исследуемые клетки. Среднее значение коэффициента поляризации при взаимодействии клеток с коллагеном остается неизменным (нет отличия от контроля), но заметно падает при использовании в качестве подложки фибронектина ($P < 0.001$).

После того как были выявлены качественные различия в распластывании клеток на коллагене и фибронектине, было изучено их совместное влияние на клетки. При исследовании совместного действия были использованы две модели — фиксированное количество в субстрате коллагена I типа при варьировании количества фибронек-

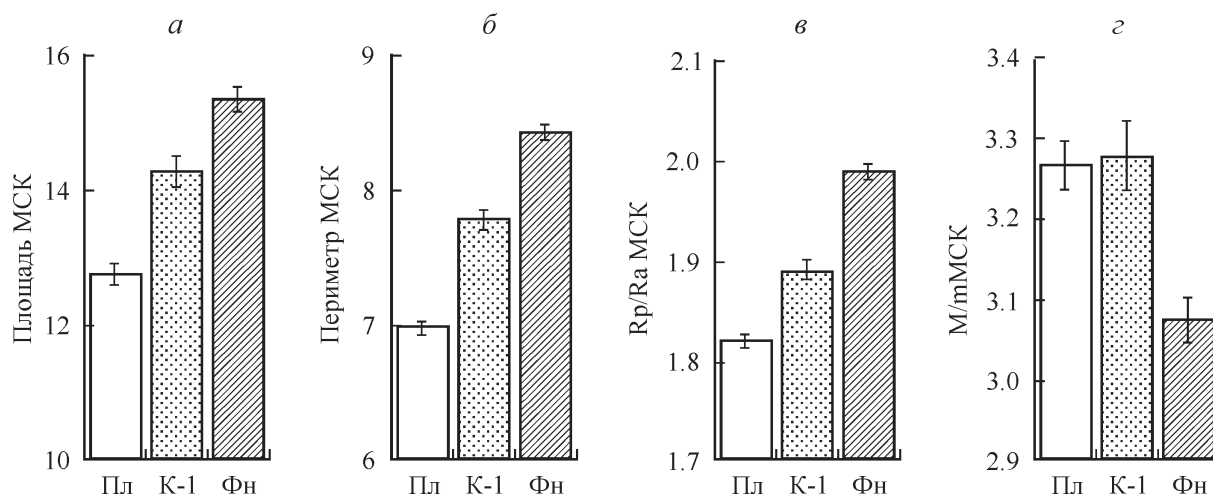


Рис. 1. Морфологические параметры мезенхимных стволовых клеток (МСК), посеянных на пластик (Пл), коллаген I типа (К-1) и фибронектин (Фн), через 16—18 ч после посева.

а — площадь клетки, пиксели $\times 1000$; б — периметр клетки, пиксели $\times 1000$; в — коэффициент распрлытывания (Rp/Ra); г — коэффициент поляризации (M/m). Представлены средние значения и их ошибки (вертикальные отрезки).

тина и, наоборот, постоянная концентрация фибронектина в сочетании с изменяющимся количеством коллагена. Первая модель использована как базовая. Данные представлены на рис. 2.

Исходя из предположения о том, что размер клеток при распрлытывании не может превысить некоторую предельную величину, для построения кривых регрессии мы воспользовались уравнением Больцмана для расчета S-образных кривых из пакета Origin 6.1. На рис. 2, а представлены данные изменения площади клеток при различных концентрациях фибронектина. Коэффициент линейной корреляции, равный 0.95 ($P < 0.01$), указывает на очень хорошее соответствие расчетной кривой экспериментальным данным. Рис. 2, б демонстрирует динамику изменения периметра клетки при тех же концентрациях фибронектина. В этом случае вероятность соответствия теоретической кривой экспериментальным значениям еще выше, коэффициент корреляции равен 0.999 ($P < 0.001$). Зависимость коэффициента распрлытывания клеток от концентрации фибронектина показана на рис. 2, в. Однако в этом случае величина коэффициента линейной корреляции несколько ниже 0.91 ($P < 0.01$).

Несмотря на то что в этих случаях для регрессии использована одна и та же формула, можно заметить, что формы кривых различаются. Однако здесь нет противоречия. В первом случае экспериментальные значения соответствуют завершению экспоненциальной фазы S-образной кривой и переходу к стационарной. Во втором и третьем случаях — участку S-образной кривой при достижении плато. Таким образом, можно прийти к заключению о том, что площадь клетки, ее периметр и коэффициент распрлытывания связаны с содержанием фибронектина в подложке (при постоянном количестве коллагена) зависимостью, описываемой S-образной кривой.

Динамику изменения коэффициента поляризации формально можно описать с помощью линейного уравнения. При этом коэффициент линейной корреляции весьма низок и равен 0.13, $P > 0.8$ (рис. 2, г), что говорит об отсутствии связи между степенью поляризации клеток и количеством фибронектина в подложке. Однако отсутствие корреляции не означает отсутствие результата. Этот ре-

зультат отрицательный и должен быть рассмотрен совместно с данными, представленными на рис. 2, а—в.

Представленные результаты говорят как о различном влиянии на клетки коллагена I типа и фибронектина, так и о зависимости доза—эффект при варьировании в подложке содержания фибронектина. Более полное представление о реакции клеток на разное содержание белков подложки можно получить, анализируя клеточную популяцию в целом. Прежде чем сделать это, необходимо определить ее гетерогенность по используемым параметрам.

Следует отметить, что хотя сам факт гетерогенности МСК известен, точных данных о соотношении различных типов клеток, входящих в популяцию, нет. Это не клетки крови, для которых хорошо известны и клеточный состав, и характерные признаки всех клеточных типов. Очевидно, что используемые нами параметры отражают весьма общие морфогенетические особенности клеток. Поэтому нельзя ожидать получения выраженных различий между некими группами клеток. Однако формальные признаки гетерогенности популяции по используемым нами параметрам обнаружить можно.

Обратимся к рис. 3, демонстрирующему частоты распределения клеток с различными значениями площади (а, б), коэффициентами распрлытывания (в, г) и поляризации (д, е) при культивировании МСК на пластике и фибронектине. Несмотря на куполообразный вид, характерный для нормального распределения, все кривые в той или иной мере заметно асимметричны, что является косвенным признаком наличия в клеточных популяциях отдельных более однородных групп. Чтобы их идентифицировать, мы использовали опцию Fit Multi-peaks программы Origin 6.1, взяв за основу нормальное распределение. Таким образом, удалось определить составляющие кривые (далее «пики») и их оптимальное соотношение. Суммирование этих кривых позволило получить очень хорошее соответствие расчетных (суммарных) кривых экспериментальным значениям. Во всех случаях коэффициент корреляции был не ниже 0.99. Подобная процедура была выполнена и во всех других случаях с использованием в качестве подложки коллагена, фибронектина и их смеси. Чтобы излишне не увеличивать объем представляемых

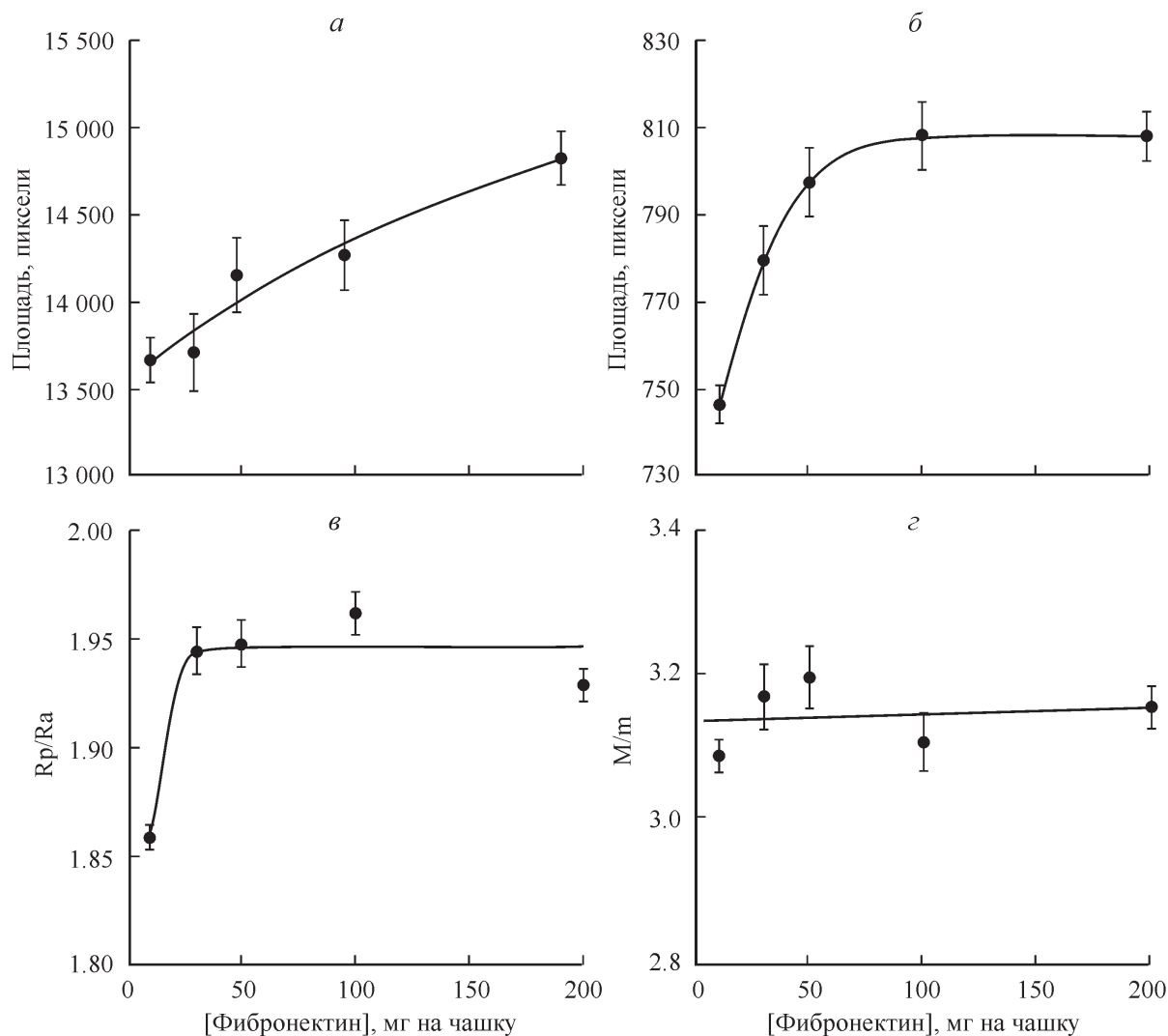


Рис. 2. Динамика изменения морфологических параметров МСК при их распластывании на подложках, состоящих из смеси коллагена I типа и фибронектина.

а — площадь клетки; *б* — периметр клетки; *в* — коэффициент распластывания (Rp/Ra); *з* — коэффициент поляризации (M/m). Объяснения см. в тексте. Кружки и вертикальные отрезки — соответственно средние значения и их ошибки. Сплошные линии — линии регрессии. Концентрация коллагена 0.5 мг на 1 чашку, а концентрация фибронектина варьировала от 10 до 200 мг на 1 чашку.

результатов, мы не включили эти данные в настоящую работу. Однако отметим, что их качество (по коэффициенту корреляции) было точно таким же. В каждом случае оптимальное число «пиков» (соответственно групп клеток или субпопуляций) для достижения максимального соответствия экспериментальных значений расчетным составляло 4 (реже 3, например на рис. 3, в). Это важно для дальнейшего анализа особенностей клеточного распластывания.

Сравним пики, т. е. расчетные кривые, используемые для построения суммарных кривых регрессии. Рассчитывая эти кривые, одновременно вычисляли соответствующие им средние значения, стандартные отклонения и ошибки средних. Полученные данные представлены на рис. 4. Перед представлением результатов объединили данные по различным концентрациям фибронектина (от 50 до 200 мг на 1 чашку). Это сделано по следующим причинам. Во-первых, эти данные по отдельности занимали промежуточное положение между данными только для коллагена и только для фибронектина (см. рис. 1, 2), т. е. их можно считать относительно однородными.

Во-вторых, объединение данных в одну группу увеличивало выборку, а следовательно, и ее представительность. Данные по минимальной концентрации фибронектина в эту группу (Фн, 50—200) не были включены. Они представлены самостоятельно (Фн, 10).

Как показывает рис. 4, независимо от типа подложки величины соответствующих пиков имеют в целом соизмеримые значения, увеличивающиеся с возрастанием номера пика (от I к IV) при измерении любого из параметров. Небольшое варьирование величин соответствующих пиков говорит об их относительной стабильности (рис. 4, а, в, д). Однако это не означает, что во всех случаях клеточные популяции одинаковы по составу. Этому противоречат различия соответствующих экспериментальных кривых на рис. 3. Кроме того, об индивидуальности состава популяций на разных подложках говорит различное процентное соотношение клеток, входящих в состав одних и тех же пиков (рис. 4, б, з, е).

Анализ данных рис. 4, а, в, д показывает, что по мере роста номера пиков прирост их значений увеличивается приблизительно на одну и ту же величину, индивидуаль-

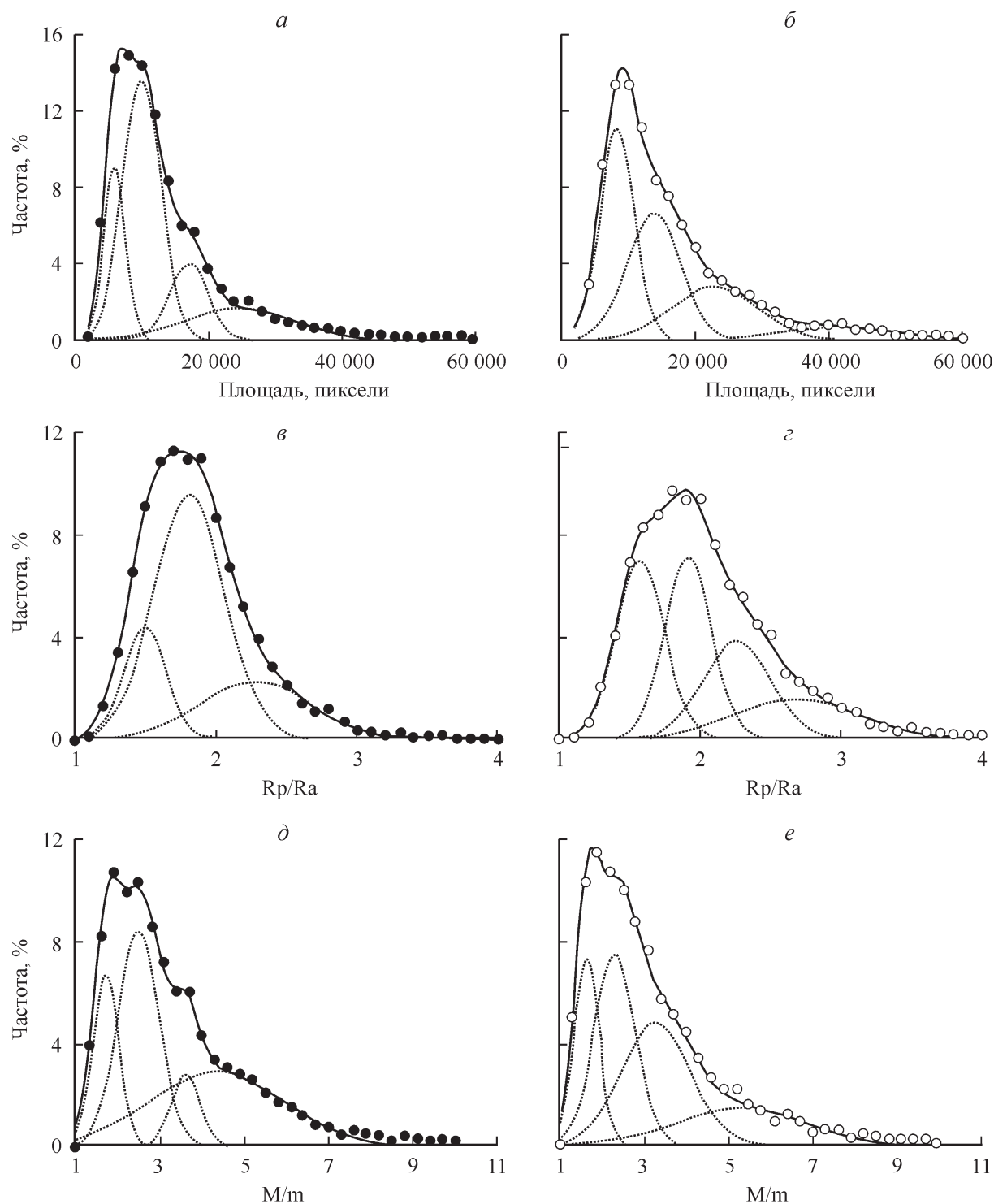


Рис. 3 Гистограмма распределения МСК, культивируемых на пластике (*a*, *v*, *d*) и на фибронектине (*b*, *z*, *e*).

Оцениваемые параметры: *a*, *b* — площадь клетки; *v*, *z* — коэффициент расплывания (Rp/Ra); *d*, *e* — коэффициент поляризации (M/m). Темные кружки — экспериментальные значения клеток на пластике, светлые кружки — экспериментальные значения на фибронектине. Сплошные линии — суммарные линии регрессии. Пунктирные линии — пики.

ную для каждого варианта. Это указывает на тесную связь между величинами пиков различных (по подложке) клеточных выборок.

Устойчивость средних значений пиков независимо от условий эксперимента (разные подложки) и их относительно постоянный сдвиг при изменении условий опыта, а также большие выборки позволили проанализировать

более тонкие изменения, происходящие с клетками при их взаимодействии с разными субстратами. В качестве иллюстрации на рис. 5 представлен наиболее наглядный результат. Задача сводилась к верификации связи между размером клетки и степенью ее расплывания на том или ином субстрате. В данном случае оценивали степень связи между периметром клеток и величиной их коэффи-

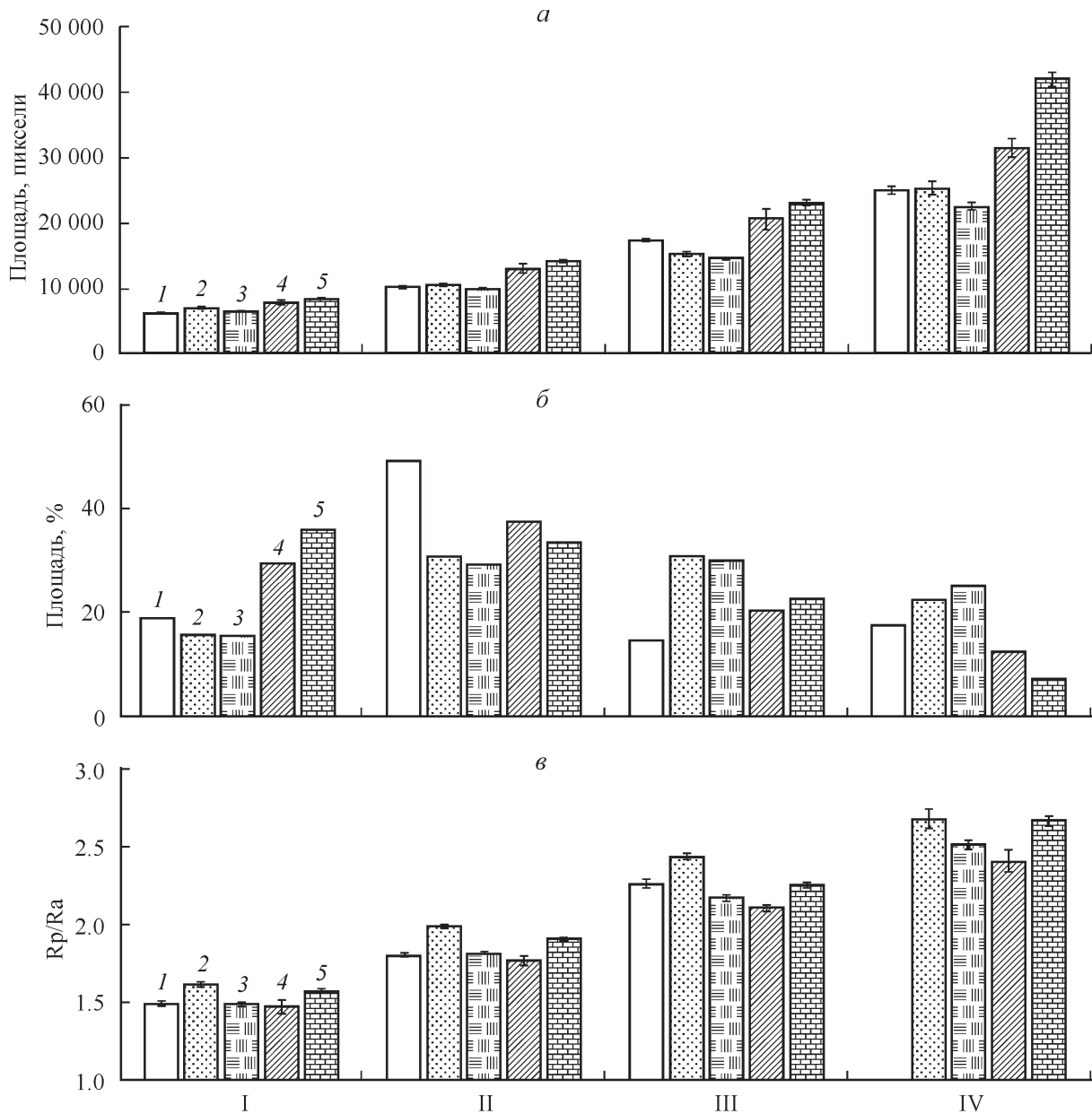


Рис. 4. Сравнение средних значений пиков I—IV (а, в, д) и соответствующие им доли клеток, культивируемых на пластике (1), коллагене (2), фибронектине (5) и их смесях, с концентрациями фибронектина 10 (3) и 50—200 (4) мг на чашку (б, з, е).

Представлены данные по площади клетки (а, б), коэффициенту расплывания (в, з) и коэффициенту поляризации (д, е). Значения пиков представлены как средние с соответствующей ошибкой (вертикальные отрезки). Дополнительные объяснения см. в тексте.

циента поляризации. Для того чтобы скорректировать меньшую частоту высоких значений по сравнению с низкими, значения периметра представлены как натуральные логарифмы. Значения коэффициента расплывания были разбиты на равные группы (разряды) и для каждой из них рассчитывали средние значения периметра (как LnP) с соответствующими ошибками. Представлены данные со значениями M/m не выше 3. При чрезмерно высоких значениях резко уменьшается количество клеток, попадающих в соответствующую группу. Это приводит к ненадежности получаемых данных из-за увеличения ошибки средних значений, зависимой от величины выборки. Тем не менее представленные данные объединяют больше 60 % всех клеток по каждому из вариантов, что позволяет экстраполировать полученный результат на клеточную популяцию в целом.

На рис. 5, а представлены полученные значения в оригинальном виде. Видно, что в целом самые низкие значения периметра у клеток в контроле выше у клеток на коллагене, самые высокие — у клеток на фибронектине. В этом нет ничего удивительного, поскольку то же отражено на рис. 1, б. Как дополнение можно отметить лишь некоторое увеличение периметра с ростом поляризации клеток для всех трех вариантов. Скачкообразный характер значений можно было бы объяснить обычной вариативностью размера клеток при их естественной миграции по субстрату. Тем не менее здесь на каждую точку приходится в среднем 100—150 клеток. Такая относительно большая выборка наводит на мысль, что разброс значений может носить и неслучайный характер. Анализ данных рис. 4 показывает, что смена подложки изменяет значения каждого из пиков приблизительно на

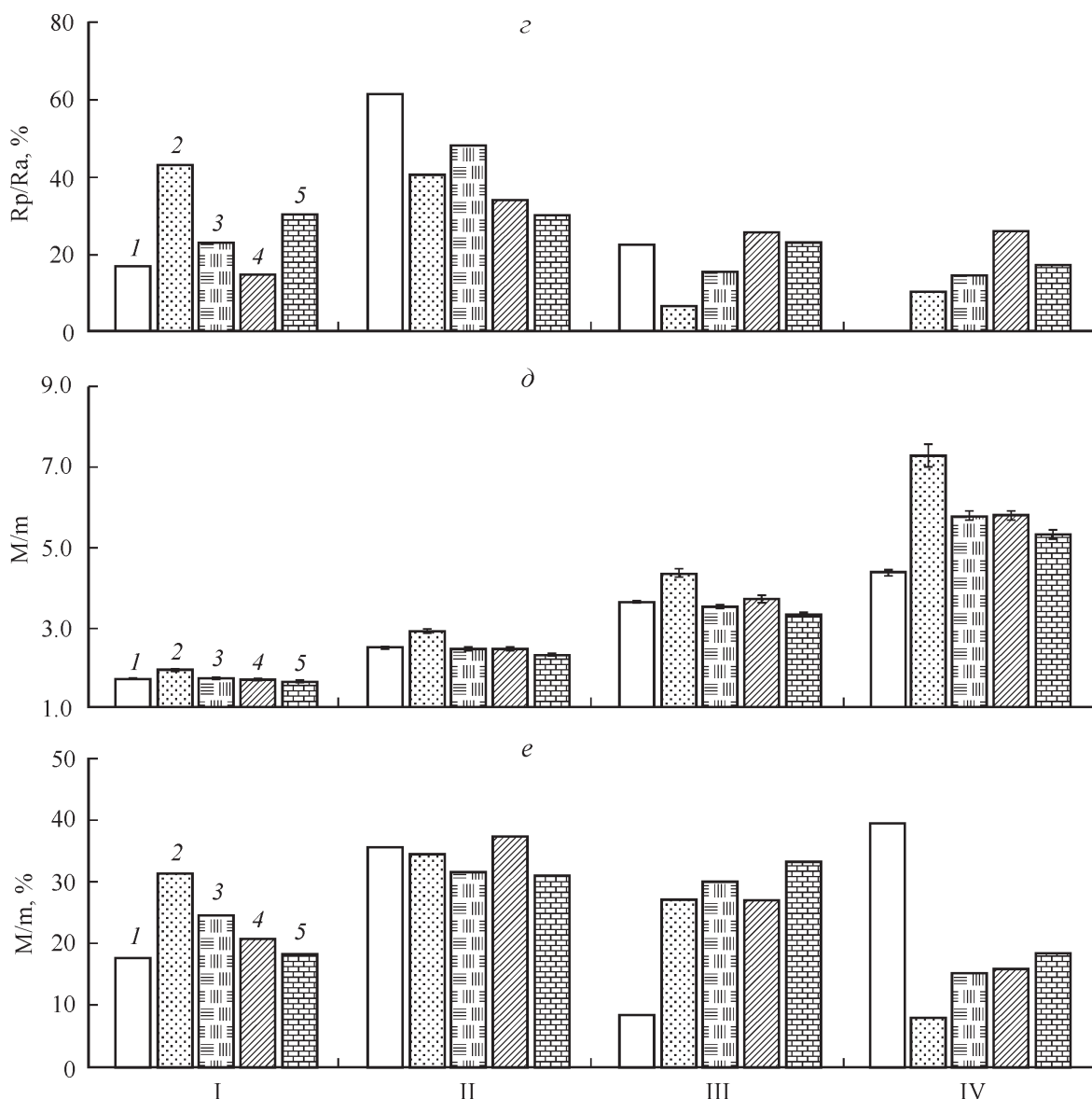


Рис. 4 (продолжение).

одну и ту же величину. Иными словами, такой сдвиг детерминируется типом подложки. Основываясь на этом факте, мы искусственно сдвинули все значения для клеток на коллагене вправо на две позиции по отношению к значениям контроля, а для клеток на фибронектине — на четыре (рис. 5, б). В результате можно наблюдать, что скачкообразный разброс значений приобрел некоторую синхронность во всех трех вариантах (в большей степени между клетками на коллагене и фибронектине), которая практически не была заметна на рис. 5, а. Полученный результат, поскольку он единственный, правильнее рассматривать как тенденцию, т. е. вероятность получения такого результата при дальнейшем изучении биологии клеток в культуре достаточно высока и ее нельзя игнорировать.

Обсуждение

Помещенные в чашку Петри клетки, утратив связь с макроорганизмом, вынуждены адаптироваться к новым условиям существования в соответствии с законами, ко-

торые могут (и, по-видимому, должны) иметь свою специфику при их культивировании *in vitro*. Поэтому клеточную культуру можно рассматривать как особую форму жизни, изолированную от всех других форм жизни. Следовательно, биологию клеток в культуре правильнее рассматривать как независимый раздел общей биологии. Изучение закономерностей адаптации к условиям культуры особенно важно для клеток первичных культур, которые планируются через некоторое время трансплантировать в макроорганизм. Как частный случай — это использование стволовых клеток для заместительной терапии.

В отличие от многочисленных исследований взаимодействия культивируемых клеток с ВКМ (Couchman et al., 1983; Are et al., 2001; Chen et al., 2004; Mammoto et al., 2004; Xia et al., 2008; Huang and Li, 2011) мы полагаем, что основным объектом биологии клеток в культуре является клеточная популяция как целое, а не отдельно взятая клетка. Ранее мы показали, как тонко изменением площади клеток и степенью их расплывания может реагировать клеточная популяция на замену ее ВКМ мат-

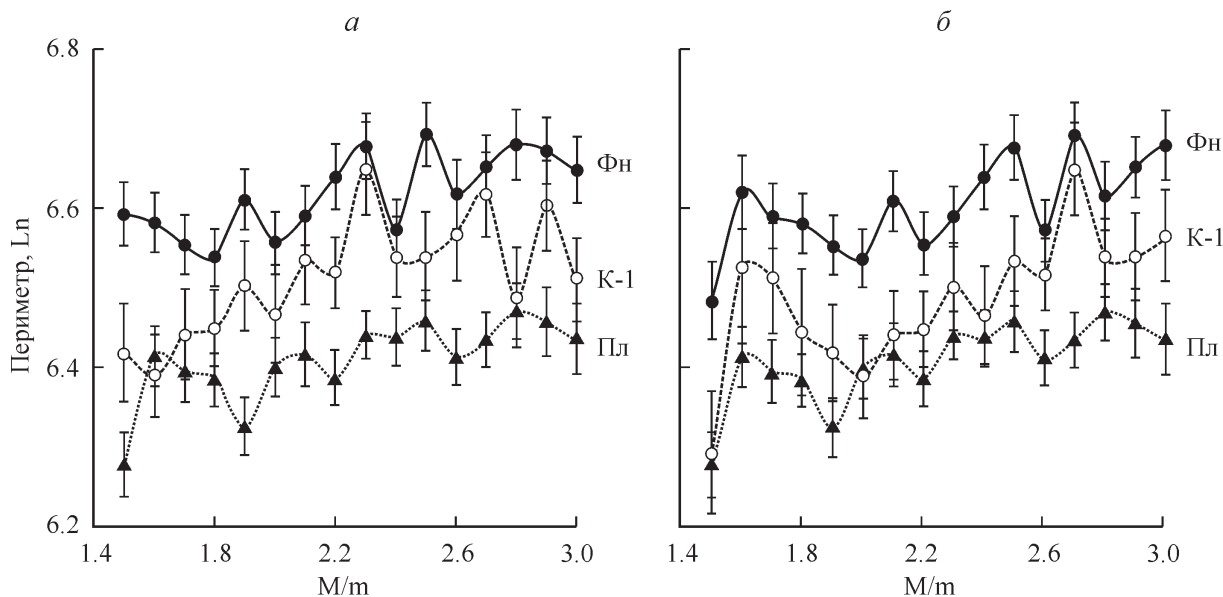


Рис. 5. Предполагаемая синхронность изменения периметра клеток, зависима от степени их поляризации.

a — без сдвига значений, *б* — после их сдвига вправо на 2 позиции для коллагена (К-1) и 4 позиции для фибронектина (Фн) по отношению к значениям на пластике (Пл). Объяснения см. в тексте.

риком другой клеточной популяции (Kuz'minykh, Petrov, 2004).

При изучении поведения клеток *in vitro* важным фактором является время, особенно при анализе распластывания клеток. Как правило, реакцию клеток на субстрат исследуют на ранних сроках (минуты, часы) после посева (Are at al., 2001; Швед и др., 2007; Rhoads, Guan, 2007; Юдинцева и др., 2008; Liu, Tirrell, 2008). Однако это не всегда корректно. Нами было показано, что в первые часы после посева морфология клеток детерминирована не только типом подложки (белковым составом), но в значительной степени и скоростью клеточного распластывания (Petrov et al., 2007). При дальнейшем культивировании резкие различия морфологии клеток (площади, периметра), распластанных на разных субстратах, постепенно нивелируются. Для клеток МСК такое состояние начинает проявляться приблизительно через 6 ч после посева. В связи с этим для исключения влияния скорости распластывания клеток на результаты изучения влияния белков ВКМ на клеточную морфологию в настоящей работе для анализа использовали клетки через 16—18 ч после посева.

Как видно на рис. 1, коллаген и фибронектин могут увеличить средний размер площади и периметра клеток всего на 10 и 20 % соответственно. Коэффициент распластывания возрастает еще меньше — на 4 и 9 %. А коэффициент поляризации для клеток, культивируемых на фибронектине, даже снижается на 6 % по сравнению с контрольными клетками на пластике. Несмотря на такие небольшие изменения клеток при распластывании, эти данные свидетельствуют о специфическом влиянии данных белков на клеточную морфологию, поскольку по условиям эксперимента фактор скорости распластывания был исключен.

Хорошее соответствие теоретических S-образных кривых (точнее, их фрагментов) экспериментальным данным (рис. 2, *a*, *б*) позволяет надеяться на возможность предсказуемого, а следовательно, и направленного влияния изменения состава ВКМ на клеточную популяцию.

Отрицательный результат в случае коэффициента поляризации указывает на то, что совместное влияние коллагена и фибронектина на клетки нельзя рассматривать как арифметическое суммирование. Эти результаты были подтверждены и в дополнительных экспериментах с варьированием концентрацией коллагена (данные не представлены).

Предположим, что и коллаген, и фибронектин действуют на клетки в одной манере (оба со знаком плюс). Тогда на подложке с коллагеном и фибронектином в точке «100» на горизонтали (рис. 2, *a*, *б*) средний размер клеток должен быть по крайней мере больше, чем при использовании только коллагена или только фибронектина. Однако этого не наблюдается. К тому же данные на рис. 1, *б*, *г* указывают на то, что коллаген и фибронектин, скорее всего, имеют разнонаправленный эффект. Если фибронектин в основном повышает долю распластанных клеток (без предположения поляризации), то коллаген способствует именно поляризации клеток. Даже если предположить независимое и разнонаправленное действие на клетки коллагена и фибронектина, то следовало ожидать, что средние размеры клеток при их совместном действии лежали бы в пределах между значениями, полученными при взаимодействии клеток с каждым из белков по отдельности. В целом это можно наблюдать, но за исключением точки, соответствующей самому низкому содержанию фибронектина — 10 мг на 1 чашку. В этом случае средние значения и для площади, и для периметра, и для коэффициента распластывания оказываются достоверно ниже соответствующих значений при использовании подложки только из коллагена. Считать этот факт случайным нет оснований. То же мы наблюдали и в предварительных опытах. Поэтому в представленной здесь серии опытов эта точка представлена тремя чашками с суммарным количеством проанализированных клеток около 6000.

Анализируя этот факт и отсутствие сколько-нибудь заметной связи между величиной коэффициента поляризации и количеством фибронектина в подложке, можно

прийти к выводу о том, что в смеси и коллаген, и фибронектин действуют на клетки не автономно, а через образование каких-то специфических комплексов. По-видимому, для образования таких функциональных комплексов необходимо некое оптимальное соотношение обоих белков, тогда как избыток любого из них будет действовать на клетки автономно.

Таким образом, взаимодействие коллагена I типа и фибронектина как между собой, так и с клетками достаточно сложно. В настоящей работе оба белка были исследованы при таких условиях, когда они взаимодействуют преимущественно с нижней частью клеточной поверхности. Однако эти белки ВКМ, продуцируемые клеткой в процессе ее жизнедеятельности, образуют своеобразную сетчатую структуру вокруг клетки (Bornstein, Ash, 1977; Mercier et al., 1996). Есть данные, указывающие на то, что фибриллярный и мономерный коллаген I типа по-разному влияют на форму распластывающихся фибробластов кожи (Sato et al., 2003). Сравнивая изображения клеток в этой работе с формой клеток в наших экспериментах, мы пришли к выводу о том, что МСК имеют большее сходство с клетками, распластывающимися на мономерном коллагене I типа.

Переходя к анализу результатов, представленных на рис. 3, следует отметить некоторые тонкости формализации этих экспериментальных данных. Для получения кривых регрессии в качестве базового распределения было использовано нормальное. Теоретической особенностью этого распределения является его абсолютная симметричность. Однако кривые регрессии, полученные на основе экспериментальных данных, всегда в той или иной степени асимметричны. Поэтому если требуется строгая формализация, экспериментальные значения лучше либо логарифмировать (особенно при большой дисперсии), либо кроме среднего и дисперсии добавить дополнительные параметры, учитывающие асимметрию реального распределения. В данном случае не было сделано ни того ни другого. Использование больших выборок позволяло нам дробить их на большое количество (до 30) разрядов для построения гистограмм. При этом отчетливо проявлялась не только асимметричность кривых распределения, но и признаки того, что эти распределения состоят из отдельных относительно автономных групп (пиков). Получение оптимальных суммарных кривых регрессии оказалось возможным при использовании 4 (реже 3) кривых нормального распределения.

Конечно, расчет пиков — это формальный подход, указывающий на наличие определенного числа автономных групп (субпопуляций) клеток по тому или иному параметру, однако есть косвенные причины считать, что так оно и есть на самом деле. Предположим, что реакция на данный белок ВКМ у всех клеток популяции одинаковая (либо в плюс, либо в минус). Тогда их характеристики распластывания должны пропорционально измениться на одну и ту же относительную величину. И как следствие число пиков при расчете должно остаться прежним, но их средние значения будут пропорционально изменены, причем на одну и ту же величину. Нечто подобное можно видеть на рис. 3, а, в, д. Однако если это истинные субпопуляции, то соотношение числа клеток в них должно остаться постоянным даже после взаимодействия с белком. Экспериментальные данные на рис. 3, б, г, е этому не соответствуют. Напротив, процентные соотношения значений пиков резко меняются.

Нет сомнения, что формирование субпопуляций должно детерминироваться на генетическом уровне. Очевидно также и то, что взаимодействие белка с клетками в течение 16—18 ч не может изменить клеточный генотип. Но фенотип может. Тогда наличие относительно постоянных пиков и их синхронное изменение при взаимодействии клеток с белками ВКМ означают, что в клеточной популяции существуют относительно стабильные функциональные состояния клеток, связанные с их распластыванием, а не истинные (генетически детерминированные) субпопуляции. Иными словами, изменение формы клетки при ее распластывании (движении) происходит во времени неравномерно. Мы предполагаем, что, изменяя свою форму, клетка в какие-то моменты (допустим, при смене направления движения) может, например, замедлять процесс распластывания. Следствием этого будет относительное увеличение в популяции доли клеток с такими «задержанными» формами, что при формализации будет проявляться в виде отдельных пиков. Косвенными подтверждениями этого предположения могут служить результаты, представленный на рис. 5, и полученные нами ранее данные о миграции по подложке клеток линии L-929 (Петров и др., 2012).

Взяты вместе, данные настоящей работы демонстрируют сложные, но неслучайные, а значит, и предсказуемые функциональные взаимосвязи между клетками и основными белками ВКМ. Поэтому разумно предполагать, что, варьируя соотношением концентраций коллагена и фибронектина в подложке, можно активно влиять на соотношение клеток, склонных к обычному распластыванию и к поляризации. Не исключено, что такого типа механизм существует при формировании тканей во время онтогенеза, в частности соединительной ткани. Если это так, то использование системы «коллаген—фибронектин» можно рассматривать как естественный (адекватный) метод направленной дифференцировки стволовых клеток в культуре.

Авторы благодарны С. Ю. Хайтлиной за обсуждение результатов и помощь при подготовке рукописи к публикации.

Список литературы

- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А., Цупкина Н. В. 2012. Динамика распластывания клеток линии L-929 после митоза. Цитология. 54 (4) : 307—312.
- Швед Ю. А., Кухарева Л. В., Зорин И. М., Блинова М. И., Билибин А. Ю., Пинаев Г. П. 2007. Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесенного на полилактидную матрицу. Цитология. 49 : 32—39.
- Юдинцева Н. М., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2008. Особенности организации цитоскелета у фибробластов нормальной, рубцовой и эмбриональной кожи человека, распластаных на белках внеклеточного матрикса. Цитология. 50 (10) : 861—867.
- Abdelwahid E., Siminiak T., Guarita-Souza L. C., Teixeira de Carvalho K. A., Gallo P., Shim W., Condorelli G. 2011. Stem cell therapy in heart diseases: a review of selected new perspectives, practical considerations and clinical applications. Curr. Cardiol. Rev. 7 : 201—212.
- Ansboro S., Greiser U., Barry F., Murphy M. 2012. Strategies for improved targeting of therapeutic cells: implications for tissue repair. Eur. Cell Mater. 23 : 310—318.

- Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U. 2001. Attachment of A431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 48 : 24—36.
- Augello A., Kurth T. B., De Bari C. 2010. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. *Eur. Cell Mater.* 20 : 121—133.
- Bornstein P., Ash J. F. 1977. Cell surface-associated structural proteins in connective tissue cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 74 : 2480—2484.
- Chamberlain G., Fox G., Ashton B., Middleton J. 2007. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 25 : 2739—2749.
- Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. *J. Biol. Chem.* 251 : 6062—6067.
- Chen Y., Abraham D. J., Shi-wen Xu, Black J. C. M., Lyons K. M., Leask A. 2004. CCN2 (Connective Tissue Growth Factor) Fibroblast Adhesion to Fibronectin. *Mol. Biol. Cell*. 15 : 5635—5646.
- Cherepanova O. A., Kalmykova N. Y., Petrov Y. P., Blinova M. I., Pinaev G. P. 2006. Contribution of $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ integrins and 67 kDa laminin receptor to the interaction of epidermoid carcinoma A-431 cells with laminin-2/4. *Cell Biol. Int.* 30 : 784—792.
- Colter D. C., Class R., Di Gildamo C. M., Prockop D. J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 3213—3218.
- Couchman J. R., Hook M., Rees D. A., Timpl R. 1983. Adhesion, growth, and matrix production by fibroblasts on laminin substrates. *J. Cell Biol.* 96 : 177—183.
- Daley G. Q., Goodell M. A., Snyder E. Y. 2003. Realistic prospects for stem cell therapeutics. In: *Hematology*. Amer. Soc. Hematol. Educ. Program. 398—418.
- Daley W. P., Peters S. B., Larsen M. 2008. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J. Cell Sci.* 121 : 255—264.
- Filip S., Mokry J., English D., Vojacek J. 2005. Stem cell plasticity and issues of stem cell therapy. *Folia Biol-Prague*. 51 : 180—187.
- Huang N. F., Li S. 2011. Regulation of the matrix microenvironment for stem cell engineering and regenerative medicine. *Ann. Biomed. Eng.* 39 : 1201—1214.
- Hung S. C., Chen N.-J., Hsieh S.-L., Li H., Ma H. L., Lo W. H. 2002. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells*. 20 : 249—258.
- Kolf C. M., Cho E., Tuan R. S. 2007. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.* 9 : 204.
- Kuz'minykh E. V., Petrov Y. P. 2004. A simple model for the study of effects of the extracellular matrix on the cell morphology *in vitro*. *Biochim. biophys. acta*. 1671 : 18—25.
- Liu J. C., Tirrell D. A. 2008. Cell response to rgd density in crosslinked artificial extracellular matrix protein films. *Biomacromolecules*. 9 : 2984—2988.
- Magnus T., Liu Y., Parker G. C., Rao M. S. 2008. Stem cell myths. *Phil. Trans. R. Soc. B363* : 9—22.
- Mammoto A., Huang S., Moore K., Oh Ph., Ingber D. E. 2004. Role of RhoA, mDia, and ROCK in cell shape-dependent control of the Skp2-p27kip1 pathway and the G₁/S transition. *J. Biol. Chem.* 279 : 26 323—26 330.
- Mercier I., Lechaire J. P., Desmouliere A., Gaill F., Aumailley M. 1996. Interactions of human skin fibroblasts with monomeric or fibrillar collagens induce different organization of the cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 225 : 245—256.
- Mimeault M., Batra S. K. 2006. Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*. 24 : 2319—2345.
- Park D.-H., Borlongan C. V., Evel D. J., Sanberg P. R. 2008. The emerging field of cell and tissue engineering. *Med. Sci. Monit.* 14 : RA206—RA220.
- Petrov Yu. P., Krylova T. A., Tsupkina N. B., Pershina V. P. 2007. Spreading as a general attribute of cell population. *J. Biol. Sci.* 7 : 102—112.
- Rhee S., Grinnell F. 2007. Fibroblast mechanics in 3d collagen matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 : 1299 — 1305.
- Rhoads D. S., Guan J.-L. 2007. Analysis of directional cell migration on defined FN gradients: role of intracellular signaling molecules. *Exp. Cell Res.* 313 : 3859—3867.
- Saha M., Ferro A. 2006. Cardiac stem cell therapy: present and future. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 61 : 727—729.
- Sato K., Hattori S., Irie S., Kawashima S. 2003. Spike formation by fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel. *Cell Structure and Function*. 28 : 229—241.
- Shi Y. 2009. Induced pluripotent stem cells, new tools for drug discovery and new hope for stem cell therapies. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2 : 15—18.
- Streuli C. H., Bissell M. J. 1990. Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *J. Cell Biol.* 110 : 1405—1415.
- Teti A. 1992. Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 2 : S83—S87.
- Vaccarino F. M., Stevens H. E., Kocabas A., Palejev D., Szekely A., Grigorenko E. L., Weissman S. 2011. Induced pluripotent stem cells: a new tool to confront the challenge of neuropsychiatric disorders. *Neuropharmacology*. 60 : 1355—1363.
- Xia N., Thodeti Ch. K., Hunt T. P., Xu Q., Ho M., Whitesides G. M., Westervelt R., Ingber D. E. 2008. Directional control of cell motility through focal adhesion positioning and spatial control of Rac activation. *FASEB J.* 22 : 1649—1659.
- Zhang Y., Khan D., Delling J., Tobiasch E. 2012. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *Sci. World J.* 2012 : 793—823.

Поступила 12 IV 2013

EFFECT OF TYPE I COLLAGEN AND FIBRONECTIN ON CELL MORPHOLOGY OF HUMAN MSCs *IN VITRO*

Yu. P. Petrov,¹ L. V. Kukhareva, T. A. Krylova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: yupe3ov@mail.ru

Limited knowledge about behaviour of stem cells in culture seems to be one of the reasons for problems in their successful introduction to applied medicine. To address this issue we have studied *in vitro* interaction of human mesenchymal stromal cells (MSCs) with various substrates (plastic, type I collagen, fibronectin, and

mixtures of these proteins at various ratios) during the 16—18 h after cell plating. Several cell morphology features such as Area, Perimeter, spreading coefficient, polarization coefficient were determined. It has been shown that MSCs respond specifically to the substrate and can be classified into several groups according to the parameters studied. Collagen preferably fibronectin have opposite effects on polarization and spreading of the cells. Collagen preferably enhances polarization of the cells, whereas fibronectin stimulates proportional spreading of cells. Effect of collagen—fibronectin mixture on the cells cannot be considered as a simple additive effect. We assume that variation in the ratio of these proteins in the extracellular matrix might be one of the possible ways to influence the morphology of stem cells when they are induced to differentiate.

Key words: extracellular matrix, cell area, cell perimeter, ratio of ECM proteins, spreading coefficient, polarization coefficient.
