

## ИЗМЕНЕНИЕ МИГРАЦИОННЫХ СВОЙСТВ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С АКТИВИРОВАННЫМИ МОНОЦИТАМИ IN VITRO

© О. А. Григорьева,<sup>1,\*</sup> И. В. Коровина,<sup>1</sup> Б. Ш. Гогия,<sup>2</sup> В. Ю. Сысоева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова и

<sup>2</sup>Институт хирургии им. А. В. Вишневского, Москва;

\* электронный адрес: go.grigorievaolga@gmail.com

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются многообещающим инструментом регенеративной медицины. Известна способность этих клеток мигрировать *in vivo* в зону повреждения (хоуминг), что во многом определяет их участие в репарации ткани. В настоящей работе рассмотрено, как изменяются миграционные характеристики МСК, выделенных из жировой ткани, после сокультивирования с активированными моноцитами, полученными из клеток линии ТНР-1. Показано, что скорость миграции МСК *in vitro* увеличивается в результате сокультивирования как в отсутствие градиента хемоаттрактанта, так и в присутствии градиента тромбоцитарного фактора роста (PDGF BB) — основного хемоаттрактанта мезенхимных клеток. Кроме того, возрастает скорость миграции МСК через один из основных белков внеклеточного матрикса — фибронектин. Установлено, что одним из возможных механизмов стимуляции миграции через фибронектин в условиях смоделированного воспаления является активация сигнализации рецептора фактора PDGF BB при связывании интегриновых рецепторов на поверхности клетки с внеклеточным матриксом.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, клеточная миграция, воспаление, PDGFR-β, интегрины.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стромальные клетки, EGF — эпителиальный фактор роста, FBS — эмбриональная телячья сыворотка, IL-1β — интерлейкин 1 бета, IL-6 — интерлейкин 6, PDGF BB — тромбоцитарный фактор роста BB, PDGFR-β — бета-цепь рецептора PDGF, PI3-киназа — фосфатидилинозитол-3-киназа, PMA — форбол-12-миристан-13-ацетат, SDF-1 — стромальный фактор-1, TGFβ — трансформирующий фактор роста бета, TNFα — фактор некроза опухоли альфа, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

Процесс регенерации включает в себя три последовательные стадии: 1) воспаление, 2) пролиферация и миграция клеток и 3) ремоделирование ткани. В ходе регенерации клетки взаимодействуют как посредством секретируемых факторов, так и за счет межклеточных контактов и контактов с матриксом. Процесс репаративной регенерации обычно происходит после определенного повреждения ткани и в большинстве случаев начинается с развития воспаления в поврежденной зоне. Среди иммунокомпетентных клеток, привлекаемых в ткань в ходе воспаления, макрофаги являются одним из основных источников цитокинов и хемокинов (Werner, Grose, 2003). Известно, что в отсутствие макрофагов заживление ран у мышей проходит со многими нарушениями, включая увеличение сроков заживления и нарушение неоваскуляризации вновь образованной ткани (Goren et al., 2009). Помимо секреции провоспалительных факторов (IL-1β, IL-6, TNFα и др.), участвующих в привлечении иммунных клеток (лимфоцитов), макрофаги создают градиент хемоаттрактантов, таких как PDGF, TGFβ, EGF, SDF-1, VEGF и др. (Brown et al., 2012). Этот градиент обеспечивает привлечение в зону повреждения фибробластов и мезен-

химных стромальных клеток (МСК), которые обуславливают переход к следующей фазе регенерации.

МСК впервые были выделены из костного мозга, но позже были обнаружены во многих взрослых органах и тканях, включая жировую, мышечную, нервную и др. (Liu et al., 2009; Keating, 2012). Выделенные и культивируемые *in vitro* эти клетки обладают похожим фенотипом (CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup>/CD79a<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/HLA II класса) и способны дифференцироваться в элементы мезенхимных тканей (остеобласты, хондроциты и адипоциты) (Dominici et al., 2006).

Мезенхимные клетки являются ключевым участником регенерации и привлекаются в очаг воспаления. Деятельность МСК в зоне повреждения (паракринная секреция цитокинов, хемокинов и факторов роста, синтез компонентов внеклеточного матрикса, иммуномодулирующее действие) во многом определяет эффективность репаративного процесса. Особенностью этих клеток является способность к хоумингу — миграции в зону повреждения, где они принимают участие в функциональном восстановлении ткани. Механизмы этого процесса в данный момент интенсивно изучаются, однако детали до

конца неясны. В значительной степени характер микроокружения, в котором происходит репарация, а значит, и активация миграции МСК, определяется воспалением, его продолжительностью и соотношением уровня различных факторов. Поэтому актуальным представляется исследование влияния иммунных клеток, в частности макрофагов, на миграционные свойства МСК.

Запуск и регуляция хемотаксиса МСК в основном осуществляются через рецепторы факторов роста. Эти клетки менее чувствительны к хемокинам, чем лейкоциты (Kollar et al., 2009; Воротников, 2011). Одним из наиболее изученных хемоаттрактантов для МСК является фактор PDGF BB, который в больших количествах выделяется при дегрануляции тромбоцитов при первичном повреждении сосудов и в избытке диффундирует в область раны (Liu et al., 2009). Рецептор к этому лиганду (PDGFR- $\beta$ ) в большом количестве обнаруживается на всех МСК, культивируемых *in vitro* (Ball et al., 2009; Кочегура и др., 2011). Известно, что внутриклеточная сигнализация этого рецептора является ключевой для миграции клеток мезенхимного ряда (Воротников, 2011; Huttenlocher, Horwitz, 2011) и включает в себя димеризацию и аутофосфорилирование рецептора, активацию PI3-киназы и привлечение на внутреннюю плазматическую мембрану киназы Akt с последующим фосфорилированием, в результате чего происходит перестройка актинового цитоскелета и начинается миграция клеток (Veever-Lowe et al., 2011). Запуск сигнального каскада тирозинкиназных рецепторов, в частности PDGFR- $\beta$ , возможен также при функциональном взаимодействии с рецепторами внеклеточного матрикса — интегринами (Kim et al., 2011).

Интегриновые рецепторы представляют собой трансмембранные гетеродимеры, образующиеся путем комбинации разных  $\alpha$ -субъединиц и более консервативных  $\beta$ -субъединиц. Интегрины осуществляют связь между внеклеточным матриксом и актиновым цитоскелетом клетки. Опосредуя сигнализацию внутрь клетки, они способны регулировать многообразные клеточные ответы, такие как выживание, рост, миграция и дифференцировка.

В настоящей работе исследовано изменение *in vitro* миграционных свойств мезенхимных клеток жировой ткани при совместном культивировании их с активированными моноцитами и выявлена роль PDGFR- $\beta$ -зависимого пути регуляции миграции МСК в условиях экспериментального воспаления.

## Материал и методика

**Реактивы:** коллагеназа I типа (Worthington, США); диспаза, PMA, PDGF BB, моноклональные антитела к PDGFR- $\beta$  и DAPI (Sigma, США); среда культивирования AdvanceSTEM™ Mesenchymal Stem Cell Basal Medium, сыворотка AdvanceSTEM™ Stem Cell Growth Supplement, 100× смесь пенициллина и стрептомицина, HyQTase™, среда RPMI1640, эмбриональная телячья сыворотка (FBS) и пируват натрия (HyClone, США); RNeasy® Mini Kit и RNase-free DNase set (Qiagen, Германия); коллаген человека I типа и фибронектин человека (ИМТЕК, Россия); AG1296 и LY294002 (Calbiochem, США), блокирующие антитела к PDGF BB (Millipore, США); формалин (Panreac, Испания); моноклональные антитела к CD29 (R&D, США); вторые антитела AlexaFluor594 (Invitrogen, США); раствор Версена (ПанЭко, Россия).

Выделение и культивирование МСК. МСК человека выделяли из подкожной жировой клетчатки здоровых доноров (возраст от 31 до 45 лет,  $n = 15$ ) согласно описанной методике (Zuk et al., 2002). Полученные клетки высаживали в чашки Петри (Corning, США) в концентрации 100 тыс. кл./мл и инкубировали при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> в среде роста AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Basal Medium, содержащей 10 % AdvanceSTEM Stem Cell Growth Supplement, 100 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина. На следующий день в чашках меняли среду для удаления неприкрепленных клеток. При достижении 80 % конфлюэнта клетки пассировали. Для этого их обрабатывали раствором Версена и раствором HyQTase и пассажили в соотношении 1 : 4. В экспериментах использовали МСК 2-го пассажа.

**Культивирование ТНР-1.** Суспензионную культуру линии ТНР-1 (моноцитарной лейкемии человека) культивировали в среде роста RPMI 1640, содержащей 10 % FBS, 1 М пирувата натрия, 100 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина.

Культивирование МСК в среде, кондиционированной клетками ТНР-1. МСК перед началом экспериментов культивировали в среде роста, не содержащей сыворотки, в течение 1 сут (голодание). Для дифференцировки клеток ТНР-1 в макрофаги использовали модифицированный протокол (Lee et al., 2012). Клетки отмывали средой без сыворотки и высаживали в чашки Петри в концентрации 500 тыс. кл./мл. В среду добавляли PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) в концентрации 50 нг/мл, через 1 ч визуально детектировали прикрепление клеток ко дну чашки. Прикрепившиеся моноциты промывали средой RPMI 1640 3 раза по 45 мин, затем к прикрепленным клеткам добавляли свежую порцию среды (1 мл на 500 тыс. клеток) и культивировали активированные моноциты в течение 48 ч. Через 24 и 48 ч активированные моноциты лизировали и анализировали профиль экспрессии генов провоспалительных факторов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$ ) для подтверждения активации. Кондиционированную клетками ТНР-1 среду собирали с чашек, фильтровали через мембрану с размером пор 0.22 мкм и добавляли в среду культивирования МСК в соотношении 1 : 1. МСК культивировали в среде, кондиционированной активированными моноцитами, в течение 24 или 48 ч. В качестве контроля к МСК после сывороточного голодания добавляли 50 % среды RPMI 1640 без сыворотки.

Для бесконтактного сокультивирования МСК с активированными моноцитами использовали трансвеллы диаметром 60 или 100 мм с размером пор 0.4 мкм (Falcon, PET track-etched membrane, США). В нижнюю камеру сажали МСК в концентрации 30 тыс. кл./мл и культивировали в среде роста без сыворотки в течение 24 ч перед экспериментом. В верхнюю камеру помещали 5 или 10 мл клеток ТНР-1 в концентрации 500 тыс. кл./мл, предварительно активировали и отмывали, как описано выше. После прикрепления клеток к мембране верхней камеры ее помещали в нижнюю, содержащую МСК. Клетки сокультивировали 24 или 48 ч. В качестве контроля в верхнюю камеру сажали 5 или 10 мл суспензии фибробластов в концентрации 80 тыс. кл./мл или добавляли среду культивирования моноцитов без сыворотки в соотношении с культуральной средой МСК 1 : 1 и культивировали 24 или 48 ч соответственно.

Выделение РНК проводили с использованием Qiagen RNeasy Mini Kit согласно протоколу фирмы-про-

изготовителя. Для удаления геномной ДНК из образцов использовали RNase Free DNase. Концентрацию РНК определяли по поглощению раствора РНК при длине волны 260 нм с помощью прибора NanoDrop200 (ThermoScientific, США).

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ) в реальном времени. Синтез кДНК проводили с использованием набора Fermentas Reverse Transcription Reagents (ThermoScientific, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе iCycler 5 (Bio-Rad, США) с использованием SYBR Green PCR Master Mix (Синтол, Россия) (12.5 мкл), 1 мкл кДНК, синтезированной на 50 нг общей РНК, и 1 мкл смеси праймеров в концентрации 1—5 мкМ. Условия проведения ПЦР: 95 °С в течение 10 мин, затем 40 циклов 95 °С и 15 с,  $t$  °С и 20 с (где  $t$  — температура, эмпирически подобранная для каждой пары праймеров), 72 °С и 20 с. Использовали следующие олигонуклеотидные последовательности праймеров (к генам человека): к *ITGA3* (прямой 5'-СТАССАААСГАТГТГСАА-3', обратный 5'-ССГААГТАСАГАТГТТСТГГ-3'); к *ITGA4* (прямой 5'-GGGGCGATTTACAGATGCAG-3', обратный 5'-ТТСТССАТТАGGGGCTACCCAG-3'); к *ITGA5* (прямой 5'-GTCGGGGGCTTCAACTTAGAC-3', обратный 5'-CCTGGCTGGCTGGTATTAGC-3'); к *ITGB1* (прямой 5'-СААГСАААТТГТГГ-3', обратный 5'-ССТТТГСТАСГГТТГТТАСАТТ-3'), к *PDGFR-β* (прямой 5'-АГСАТСТТСТГТТСТГАССТГ-3', обратный 5'-ТАТТСТСССГТГСТАГСССА-3'). Содержание исследуемых мРНК нормировали по уровню сигнала, получаемого для кДНК генов домашнего хозяйства (*actin* и *gapdh*). Все эксперименты дублировали для каждого образца клеток.

Модель «царапины» *in vitro* (scratch assay). Для оценки скорости миграции МСК использовали модель миграции клеток в рану монослоя *in vitro*. МСК 2-го пассажа высаживали в 12-луночный планшет и культивировали до монослоя. Перед экспериментом клетки голодали в среде роста без сыворотки в течение 1 сут. В лунки добавляли среду, кондиционированную активированными моноцитами, в соотношении 1 : 1 или среду RPMI 1640 без сыворотки в качестве контроля. В каждой лунке прочерчивали «царапину» стерильным синим наконечником. С помощью микроскопа Leica AF6000LX и камеры Leica DFC 350FX проводили цейтраферную съемку двух полей зрения в каждой лунке через каждые 30 мин в течение 48 ч. Для каждого образца клеток эксперимент дублировали. Скорость миграции одиночных клеток в рану анализировали с помощью программы ImageJ, измеряли скорость перемещения ядер 50 клеток в пикселях за 1 ч (пкс/ч) в каждом фильме.

Миграция в системе xCELLigence. Для оценки направленной миграции использовали CIM-plate (16-луночные планшеты) для прибора xCELLigence (ACEA Biosciences, Inc., США). Планшет представляет собой модифицированную камеру Бойдена, состоящую из верхней и нижней камер, разделенных мембраной с диаметром пор 8 мкм. На нижней поверхности мембраны электрод из чередующихся полос снимает показания импеданса, которые прямым образом зависят от числа клеток, мигрировавших с верхней стороны мембраны. Таким образом, прибор xCELLigence получает значения клеточного индекса в относительных единицах в режиме реального времени. Разделительную мембрану с диаметром пор 8 мкм покрывали с двух сторон стерильным раство-

ром белка внеклеточного матрикса: фибронектина человека (50 мкг/мл) или коллагена человека I типа (10 мкг/мл). В верхнюю камеру добавляли 100 мкл среды без клеток, через 30 мин снимали фоновые значения согласно протоколу фирмы-производителя. Затем в верхние лунки добавляли по 20 тыс. МСК 2-го пассажа, предварительно культивированных с активированными моноцитами, или МСК, предварительно культивированных в RPMI 1640, как было описано выше. В нижнюю камеру для миграции помещали среду культивирования без сыворотки, содержащую 10 нг/мл БСА (отрицательный контроль), среду культивирования, содержащую 10 % FBS (положительный контроль), PDGF BB (10 нг/мл), ингибитор аутофосфорилирования рецептора PDGFR-β (AG1296, 25 мкМ), ингибитор фосфоинозитол-3-киназы (LY294002, 25 мкМ), блокирующие антитела к PDGF BB (50 нг/мл); или комбинацию PDGF BB (10 нг/мл) и блокирующих антител к нему (50 нг/мл) в качестве контроля действия антител. Значения клеточного индекса регистрировали в течение 48 ч с интервалом 15 мин. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения RTCA Software (ACEA Biosciences, Inc.).

Иммуноцитохимия. МСК 2-го пассажа культивировали в среде без сыворотки в течение 1 сут и далее сокультивировали 24 ч с активированными моноцитами в трансвеллах, как было описано выше. В качестве контроля добавляли среду RPMI 1640 без сыворотки в соотношении 1 : 1. Затем клетки промывали фосфатно-солевым раствором и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида в течение 10 мин. Для выявления мембранных белков использовали моноклональные мышиные антитела против PDGFR-β и CD29 (интегрин β1) человека и вторые антитела AlexaFluor594. Ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем DAPI. Анализировали полученные препараты с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B, снабженного камерой Leica DFC 360FX.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 6.0. Данные представлены в виде средних величин и их стандартных ошибок. Для проверки достоверности различий в численных данных между опытными и контрольными группами в связи с малым объемом выборок применяли односторонний непараметрический критерий Манна—Уитни.

## Результаты

Измерение подвижности МСК в среде, кондиционированной активированными моноцитами. При добавлении к МСК среды, кондиционированной активированными моноцитами, клетки изменяли морфологию, вытягивались и приобретали веретеновидную форму без ламеллоподий (рис. 1). Таким образом, в результате воздействия среды, кондиционированной активированными моноцитами, МСК приобретали «промиграционный» фенотип. Клетки в контроле сохраняли характерную распластанную форму.

Подвижность МСК измеряли на модели царапины монослоя. Средняя скорость движения клеток при действии среды, кондиционированной активированными моноцитами, составляла  $10.49 \pm 1.21$  пкс/ч. В контроле клетки двигались со средней скоростью  $5.34 \pm 1.47$  пкс/ч. Таким образом, средняя скорость миграции МСК без гра-

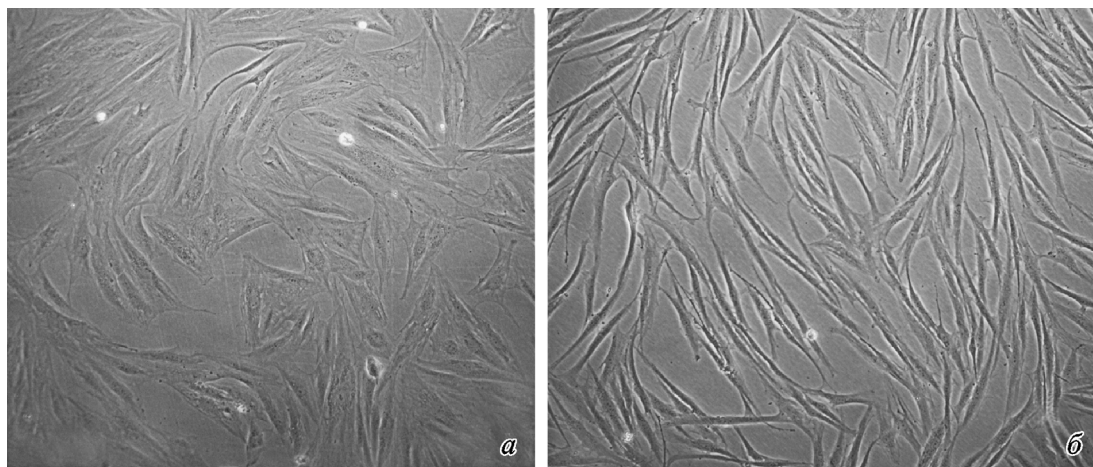


Рис. 1. Влияние кондиционированной среды активированных моноцитов на форму МСК жировой ткани.

*a* — контрольные клетки; *б* — веретеновидная форма МСК через 24 ч культивирования в среде, кондиционированной активированными моноцитами. Об.: 20×.

диента хемоаттрактанта при добавлении среды, кондиционированной активированными моноцитами, увеличивалась почти вдвое (рис. 2).

Измерение скорости миграции МСК в системе xCELLigence. Для покрытия разделительной мембраны были использованы два основных белка внеклеточного матрикса — коллаген I типа и фибронектин. Эти белки традиционно применяют в качестве внеклеточного матрикса в экспериментах, в которых оценивают направленную миграцию клеток. Обнаружено, что в системе xCELLigence средняя скорость миграции МСК за первые 8 ч с начала эксперимента через мембрану, покрытую фибронектином, была значительно выше скорости миграции через мембрану, покрытую коллагеном I типа (рис. 3, *a*). Исходя из полученных результатов все эксперименты по миграции МСК в системе xCELLigence проводили с использованием фибронектина в качестве матрикса для миграции МСК ЖТ.

Измерение скорости направленной миграции МСК на PDGF BB в системе xCELLigence после предварительного сокультиви-

рования с активированными моноцитами. Анализ направленной миграции МСК по градиенту хемоаттрактанта проводили с использованием системы xCELLigence. Одним из наиболее изученных хемоаттрактантов для мезенхимных клеток является PDGF BB. Добавление в нижнюю камеру планшета 10 нг/мл PDGF BB стимулировало миграцию МСК, и ее скорость возрастала в 2.8 раза по сравнению с отрицательным контролем (рис. 3, *б*). После предварительного сокультивирования с активированными моноцитами МСК в 2.7 раза быстрее, чем контрольные клетки, двигались в направлении градиента PDGF BB (рис. 3, *б*, столбец 2). Таким образом, оказалось, что сокультивирование с активированными моноцитами увеличивает чувствительность МСК к хемоаттрактанту PDGF BB. Интересно отметить, что после сокультивирования с активированными моноцитами клетки быстрее мигрировали через мембрану, покрытую фибронектином, даже без градиента PDGF BB.

Оценка уровня экспрессии гена PDGFR- $\beta$  и его белка в МСК при сокультивировании с активированными моноцитами. По данным ОТ-ПЦР, уровень экспрессии гена фактора PDGFR- $\beta$  в МСК, сокультивируемых с активированными моноцитами в течение 24 ч, возрастает в среднем в 24.7 раза, по сравнению с клетками в контроле (рис. 4). По данным иммуноцитохимического исследования, через 24 ч сокультивирования увеличивается количество рецепторов PDGFR- $\beta$  на мембране МСК (рис. 5). Таким образом, факторы, выделяемые активированными моноцитами, вызывают увеличение числа рецепторов к PDGF BB на мембране МСК. В результате этого в воспалительных условиях растет чувствительность МСК к их основному хемоаттрактанту (PDGF BB).

Влияние блокирующих антител к PDGF BB на скорость миграции МСК через фибронектин. Итак, мы обнаружили, что МСК после сокультивирования с активированными моноцитами мигрируют в системе xCELLigence быстрее, чем контрольные клетки. Скорость МСК росла даже в отсутствие экспериментального градиента хемоаттрактанта. Поскольку и макрофаги, и МСК способны секретировать PDGF BB, мы проверили, стимулирует ли эндогенный PDGF BB направленную миграцию МСК ЖТ. Для этого в системе

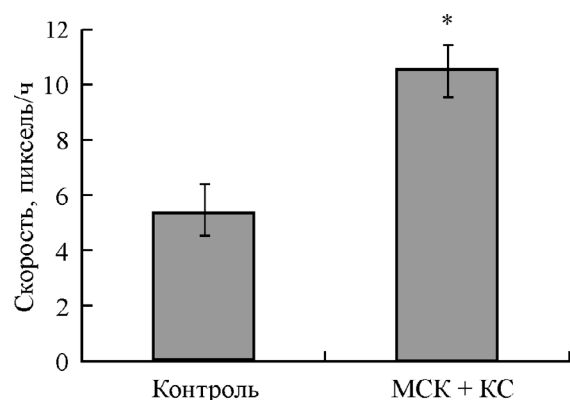


Рис. 2. Изменение скорости движения МСК при действии кондиционированной среды (КС) от активированных моноцитов при отсутствии градиента хемоаттрактанта на модели царапины (scratch assay).

Вертикальные отрезки — стандартные ошибки среднего; звездочкой показана достоверность различий при  $P < 0.05$ .

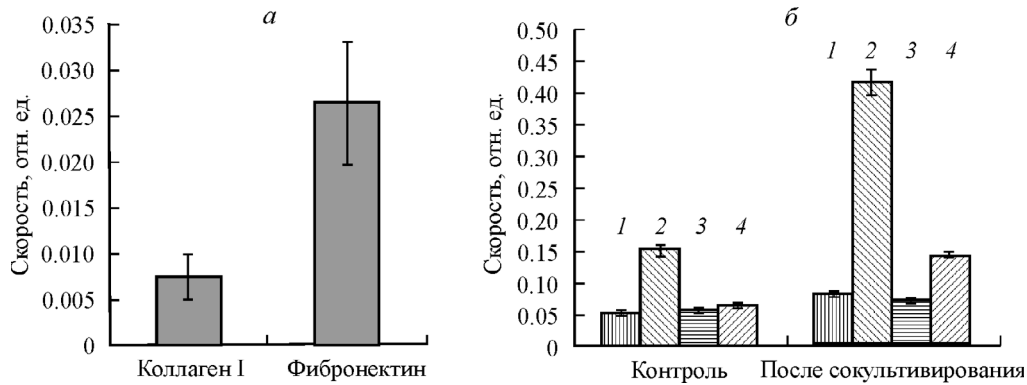


Рис. 3. Средняя скорость направленной миграции МСК в системе xCELLigence.

а — скорость миграции в течение первых 8 ч эксперимента через мембрану, покрытую коллагеном I типа и фибронектином. б — после сокультивирования с активированными моноцитами; столбец 1 — отсутствие хемоаттрактанта, 2 — 10 нг/мл PDGF BB, 3 — в присутствии блокирующих антител к PDGF BB, 4 — в присутствии 10 нг/мл PDGF BB и блокирующих антител к нему. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки среднего.

xCELLigence в нижнюю камеру добавляли 10 нг/мл PDGF BB (положительный контроль), 50 нг/мл блокирующих антител к PDGF BB (для блокирования аутокринного действия фактора) или комбинацию PDGF BB (10 нг/мл) и блокирующих антител (50 нг/мл). В верхнюю камеру на мембрану, покрытую фибронектином, вносили МСК 2-го пассажа, предварительно сокультивированные с активированными моноцитами в течение 1 сут, либо контрольные МСК. При добавлении блокирующих антител вместе с PDGF BB частично снижалась скорость стимулированной этим фактором клеточной миграции. Однако оказалось, что блокирующие антитела, нанесенные отдельно, не снижали скорости миграции МСК через фибронектин. Это говорит об отсутствии аутокринного действия эндокринного PDGF BB в данной системе (рис. 3, б). Таким образом, в нашей модели мы не наблюдали аутокринной стимуляции миграции МСК за счет секреции PDGF BB.

Из полученных данных следует, что сокультивирование с моноцитами увеличивает скорость направленной миграции МСК через фибронектин. Добавление блокирующих антител к PDGF BB не снимает полностью эффекта сокультивирования с моноцитами. Эти данные позволили нам предположить, что помимо стимуляции PDGF BB существует другой механизм запуска миграции МСК, который активируется под действием факторов, выделяемых активированными моноцитами.

Влияние ингибиторов сигнального каскада PDGFR- $\beta$  на скорость направленной миграции МСК в системе xCELLigence. Мы проверили, участвует ли в активации миграции МСК сигнальный путь, который запускается через PDGFR- $\beta$ . Для этого в системе xCELLigence в нижнюю камеру добавляли ингибиторы его сигнального каскада: AG1296 (25 мМ), препятствующий аутофосфорилированию димеризованного рецептора, или LY294002 (25 мМ), действие которого ингибирует PI3-киназу сигнального каскада. В верхнюю камеру на мембрану, покрытую фибронектином, добавляли МСК 2-го пассажа, предварительно сокультивированные с активированными моноцитами в течение 1 сут, либо контрольные клетки. В течение первых 8 ч после начала эксперимента скорость миграции МСК, предварительно сокультивированных с активированными моноцитами, была в 2.46 раза выше, чем контрольных клеток. При этом действие ингибиторов подавляло миг-

рацию клеток, снижая ее скорость в контроле и эксперименте соответственно в 3.3 и 12.33 раза при действии LY294002 и в 2.43 и 6.03 раза при действии AG1296 (рис. 6). При действии ингибиторов скорость миграции контрольных и опытных клеток значительно не различалась. Эти данные свидетельствуют о том, что при миграции через фибронектин в МСК работает сигнальный каскад от рецептора PDGFR- $\beta$ . В условиях сокультивирования под влиянием секретируемых активированными моноцитами факторов число рецепторов PDGFR- $\beta$  на мембране МСК существенно увеличивается, в результате чего возрастает скорость движения клеток при связывании с фибронектином.

Оценка уровня экспрессии генов интегринов  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  и уровень белка интегрин  $\beta 1$  (CD29) в МСК при сокультивировании с активированными моноцитами. Известно, что активация рецепторов ростовых факторов может быть вызвана связыванием внеклеточного матрикса интегриновыми рецепторами. Мы проанализировали, как изменяется количество мРНК основных цепей интегринов, принимающих участие во взаимодействии с белками внеклеточного матрикса (коллагеном I типа, фибронекти-

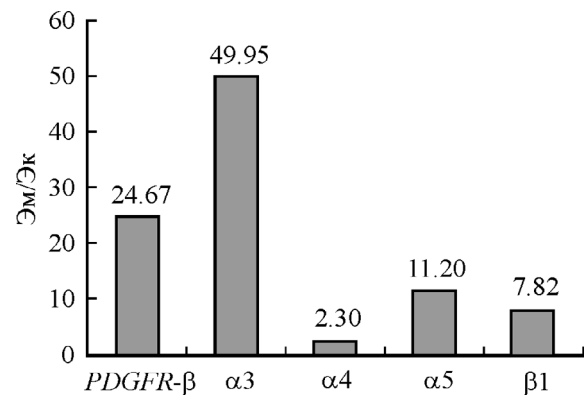


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии генов рецептора PDGFR- $\beta$  и цепей интегринов ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  и  $\beta 1$ ) при совместном культивировании МСК с активированными моноцитами в течение 24 ч.

Результаты представлены в виде отношения уровня экспрессии (Э) гена в МСК после культивирования с активированными моноцитами (Эм) к уровню экспрессии гена в клетках в контроле (Эк).

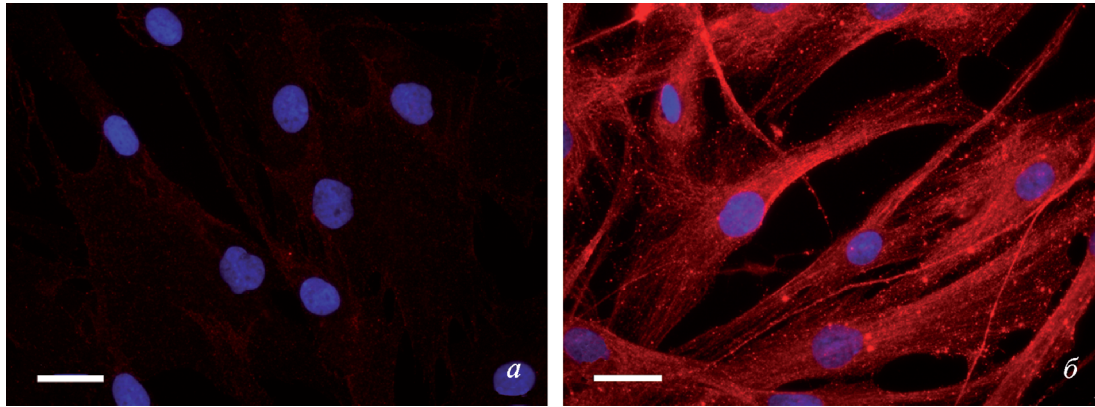


Рис. 5. Увеличение экспрессии рецептора PDGFR- $\beta$  на поверхности МСК после их сокультивирования с активированными моноцитами.

*a* — контроль; *б* — сокультивирование. Иммунофлуоресцентное мечение антителами против PDGFR- $\beta$  (красный цвет). Ядра докрашены DAPI (синий цвет). Масштабный отрезок — 25 мкм.

ном и ламинином) в МСК после сокультивирования с активированными моноцитами. По данным ОТ-ПЦР, уровень экспрессии гена интегрин  $\beta 1$  (CD29) в МСК, сокультивируемых с активированными моноцитами в течение 24 ч, возрастает в среднем в 7.8 раза по сравнению с клетками в контроле. В среднем в 50 раз увеличивается уровень экспрессии гена цепи интегрин  $\alpha 3$  и в 11.2 раза — цепи интегрин  $\alpha 5$  (рис. 4). По данным иммуноцитохимического исследования, количество белка интегрин  $\beta 1$  экспрессированного на поверхности МСК, также увеличивается через 24 ч сокультивирования (рис. 7). Интегрин  $\alpha 3 \beta 1$  является рецептором для связывания клеток с фибронектином и ламинином, а интегрин  $\alpha 5 \beta 1$  — с фибронектином. Можно предположить, что увеличение концентрации интегрин на мембране МСК в условиях сокультивирования с активированными моноцитами и их взаимодействие с фибронектином могут приводить к активации PDGFR- $\beta$ , что опосредует увеличение скорости движения клеток по фибронектину.

### Обсуждение

При регенерации тканей МСК координируют ее восстановление: синтезируют внеклеточный матрикс, формируя строму для внедрения других клеток (эндотелио-



Рис. 6. Средняя скорость миграции через фибронектин МСК ЖТ, как контрольных, так и предварительно сокультивированных с активированными моноцитами (столбцы 1), значительно снижалась при воздействии ингибиторов сигнальных путей PDGFR- $\beta$  LY294002 (ингибитор PI3-киназы, столбцы 2) и AG1296 (ингибитор аутофосфорилирования цепей PDGFR- $\beta$ , столбцы 3).

цитов, резидентных тканеспецифичных предшественников) (Wight et al., 1986); секретируют ангиогенные и нейротрофические факторы, стимулируя реваскуляризацию и подрастание нейритов (Horwitz, Dominici, 2008; Rubina et al., 2009); секретируют хемокины, регулируя иммунный ответ (Rasmussen, 2006; Chen et al., 2011); кроме того, МСК способны дифференцироваться в функционально активные элементы ткани (остеобласты, хондроциты и адипоциты) (Pittenger et al., 1999; Zuk et al., 2001).

Поиск механизмов миграции МСК в зону повреждения является одной из ключевых задач для регуляции процессов регенерации ткани. Воспаление и сопутствующие ему факторы во многих случаях играют главную роль в привлечении в регенерирующую ткань клеток, в том числе иммунокомпетентных клеток и МСК (Spaeth et al., 2008). Однако если иммунные клетки движутся преимущественно по градиенту хемокинов, то мезенхимные стромальные клетки в большей степени реагируют на градиент факторов роста (PDGF BB, IGF-1, EGF и HGF) (Ponte et al., 2007). Одним из наиболее изученных факторов, стимулирующих миграцию МСК как из костного мозга, так и жировой ткани, является PDGF BB. Он в большом количестве высвобождается из тромбоцитов при повреждении сосудов и в избытке диффундирует в рану и прилежащие ткани. Показано, что PDGF BB стимулирует миграцию и пролиферацию мезенхимных клеток *in vitro* (De Donatis et al., 2008), кроме того, большую роль это фактор играет при заживлении ран *in vivo* (Liu et al., 2009).

Некоторые провоспалительные цитокины, такие как TNF $\alpha$ , IL-6, могут модифицировать миграционные свойства МСК, повышая их чувствительность к воздействию разного рода других факторов, в частности хемокинов и факторов роста. Возможно, механизм такого действия связан со стимуляцией экспрессии генов и синтеза молекул рецепторов к данным белкам (Ponte et al., 2007). Основным источником цитокинов и хемокинов в зоне воспаления являются моноциты, которые дифференцируются в макрофаги (Werner, Grose, 2003). Многие из факторов, секретируемых макрофагами (TGF $\beta$ , IGF-1, PDGF и FGF-2), являются хемотактическими молекулами для МСК (Monaco, Lawrence, 2003) и способны непосредственно привлекать МСК костного мозга в зону воспаления. Кроме того, эти факторы способны стимулировать формирование у МСК костного мозга промиграционного фенотипа; в частности, при воздействии среды, конди-

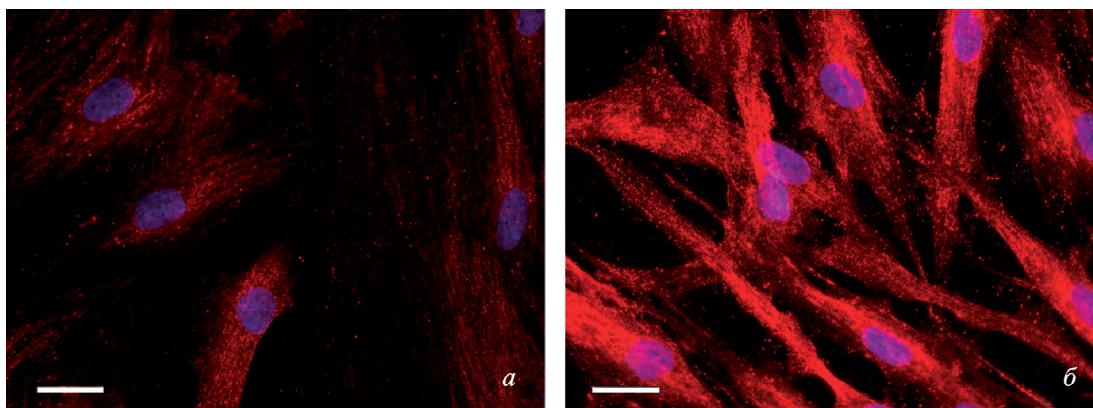


Рис. 7. Иммуноцитохимическое выявление рецепторов интегрин  $\beta 1$  на мембране контрольных МСК 2-го пассажа (а) и при совместном культивировании МСК с активированными моноцитами в течение 24 ч (б).

Использовали антитела против CD29 (красный цвет). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Масштабный отрезок — 25 мкм.

онированной макрофагами, изменяется экспрессия ряда рецепторов к хемотактическим молекулам (хемокинам) на МСК костного мозга, в результате чего повышается их чувствительность к воздействию хемоаттрактантов (Anton et al., 2007). Однако мобилизация МСК костного мозга происходит при обширных повреждениях, когда избыток хемотактических молекул выбрасывается в системный кровоток. При локальных повреждениях воспалительное окружение, которое включает в себя как непосредственный межклеточный контакт местных МСК с иммунокомпетентными клетками, так и паракринные факторы, вероятно, в первую очередь активирует МСК прилежащей ткани. Помимо костного мозга МСК обнаруживают в разных органах и тканях, в том числе жировой ткани, в которой до 10 % клеток представляют резидентные макрофаги (Brown et al., 2012). Поэтому важной задачей является проследить, как активируется миграция МСК жировой ткани при взаимодействии с моноцитами и макрофагами при развитии воспаления.

Для исследования такого взаимодействия мы использовали модель *in vitro* бесконтактного сокультивирования МСК, выделенных из жировой ткани и активированных промоноцитов линии ТНР-1, в которой клетки не контактируют непосредственно, но способны обмениваться секретируемыми факторами. Известно, что моделирование воспаления с помощью моноцитов (макрофагов) — сложная задача, поскольку в процессе активации происходит поэтапное изменение экспрессии про- и противовоспалительных факторов (Qin, 2012). При разработке модели мы оценивали профиль экспрессии активированных моноцитов для подтверждения их активации. Через 24 ч после активации в клетках ТНР-1 наблюдали значительное увеличение экспрессии генов провоспалительных факторов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$ ). В то же время значительного роста уровня мРНК противовоспалительных факторов (IL-4, IL-10, IL-13 и TGF $\beta$ ) в нашей системе не прослеживалось.

Ранее другими авторами было показано, что действие отдельных провоспалительных факторов (TNF $\alpha$  и INF $\gamma$ ) (Ponte et al., 2007) или среды, кондиционированной макрофагами (Anton et al., 2012), стимулирует миграцию МСК костного мозга *in vitro*. Мы предположили, что провоспалительные факторы, секретируемые активированными моноцитами, способны изменять функциональную активность МСК жировой ткани в системе сокультивирования, в том числе активировать их миграцию.

И действительно, на модели царапины (scratch assay) обнаружено, что скорость движения МСК возрастает при действии среды активированных моноцитов. Строго говоря, модель показывает изменение скорости перемещения клеток по направлению в рану в отсутствие градиента хемоаттрактанта (направленная миграция, которая не является хемотаксисом). Хемотаксис же является результатом взаимодействия хемоаттрактанта с рецептором и последующего запуска сигнальных каскадов внутри клетки, которые вызывают изменение клеточной полярности, что помогает клетке двигаться в определенном направлении (Welf, Haugh, 2011).

При разработке модели для направленной миграции оказалось технически невозможным использовать в качестве аттрактанта в нижней камере активированные моноциты. Поэтому сокультивирование с моноцитами проводили непосредственно перед помещением МСК в камеру для миграции. Учитывая, что *in vivo* в ране присутствует PDGF BB в высокой концентрации, мы использовали его в качестве контрольного хемоаттрактанта.

Анализируя изменение скорости направленной миграции в системе xCELLigence, мы обнаружили, что МСК после сокультивирования с активированными моноцитами значительно быстрее контрольных клеток мигрируют по градиенту PDGF BB, одного из основных хемоаттрактантов для мезенхимных клеток, т. е. паракринные факторы, выделяемые активированными моноцитами, не только увеличивают подвижность клеток, но и вызывают увеличение направленной миграции по градиенту PDGF BB.

Фактор PDGF существует в виде гомо- или гетеродимера, состоящего из А- и В-полипептидных цепей. Его биологическая активность осуществляется за счет связывания с двумя структурно схожими тирозинкиназными рецепторами — PDGFR- $\alpha$  и PDGFR- $\beta$ . Причем доказано, что для запуска хемотаксиса мезенхимных клеток необходима именно  $\beta$ -цепь рецептора (Siegbahn et al., 1990). После связывания с лигандом рецептор PDGFR гомоили гетеродимеризуется и фосфорилируется по остаткам тирозина. Одними из ключевых участников сигнальных путей, обеспечивающих запуск хемотаксиса, является PI3-киназа, которая фосфорилирует белок Akt по остатку Ser473, после чего требуется фосфорилирование Akt по остатку Tyr308 для последующей реорганизации актинового цитоскелета и миграции клеток (Veever-Lowe et al., 2011).

Примечательно, что в наших экспериментах в системе xCELLigence даже в отсутствие хемоаттрактанта PDGF BB в нижней камере планшета скорость МСК, предварительно культивированных с активированными моноцитами, была выше, чем скорость контрольных клеток. При этом такую разницу в скорости миграции мы отмечали только в случае, когда мембрана, через которую мигрировали клетки, была покрыта фибронектином, но не коллагеном I типа.

Известно, что МСК и макрофаги могут секретировать PDGF BB. Чтобы исключить аутокринные эффекты PDGF BB, мы добавили клеткам блокирующие антитела к PDGF BB. Как следует из приведенных данных, скорость клеток в присутствии блокирующих антител существенно не менялась. Таким образом, мы сделали вывод о том, что аутокринный PDGF BB существенно не влиял на миграцию МСК через фибронектин.

В настоящее время накоплен большой объем данных, указывающий на активацию рецепторов факторов роста при связывании поверхности клетки с белками внеклеточного матрикса через интегриновые рецепторы (Miyamoto et al., 1996; Moro et al., 1998; Wang et al., 2001). При этом активируются внутриклеточные сигнальные каскады, регулирующие выживание, пролиферацию и миграцию клеток. Такой путь активации рецептора не требует непосредственного связывания его с лигандом — фактором роста. Интегриновые комплексы состоят из двух субъединиц ( $\alpha$  и  $\beta$ ), разные комбинации которых отвечают за узнавание и связывание с определенными белками внеклеточного матрикса или межклеточные взаимодействия. Так, интегрин  $\alpha 5 \beta 1$  связывается с фибронектином, а интегрин  $\alpha 3 \beta 1$  — с фибронектином и ламинином. В частности, исследован путь активации рецептора PDGFR- $\beta$  в МСК жировой ткани при связывании с фибронектином, причем показано, что это взаимодействие опосредуется интегрином  $\alpha 5 \beta 1$  и активацией PI3-киназы и Akt (Veivers-Lowe et al., 2011).

Чтобы определить роль такого взаимодействия в нашей системе миграции, мы использовали ингибиторный анализ. Обнаружили, что ингибирование аутофосфорилирования рецептора PDGFR- $\beta$  (с помощью AG1296) или фосфорилирования PI3-киназы (с помощью LY294002) в МСК и в эксперименте, и в контроле снижало скорость миграции клеток через фибронектин ниже базового уровня (скорости миграции контрольных клеток через фибронектин в отсутствие ингибиторов и хемоаттрактантов). Однако при ингибировании аутофосфорилирования PDGFR- $\beta$  скорость миграции МСК оказалась выше, чем при ингибировании PI3-киназы. Фосфорилирование PI3-киназы происходит также при стимуляции рецепторов других факторов роста, таких как IGF-1, HGF и EGF, поэтому ингибирование PI3-киназы, вероятно, отменяет и их действие. При действии ингибиторов скорость стимулированных и контрольных клеток в наших экспериментах не различалась. Эти данные позволили нам сделать вывод о том, что активация сигнализации рецептора PDGFR- $\beta$  при миграции МСК через фибронектин является ключевой при стимуляции движения клеток в такой системе.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что рецептор PDGFR- $\beta$  выявляется практически на всех культивируемых МСК жировой ткани 2-го пассажа (Кочегура и др., 2011). Мы предположили, что инкубация клеток с активированными моноцитами может увеличивать экспрессию рецептора PDGFR- $\beta$ . Анализ с помощью ОТ-ПЦР выявил значительный рост (в 24.67 раза) уровня мРНК

рецептора, что также было подтверждено на уровне белка иммуноцитохимически. Как упоминалось выше, интегрины, связываясь с матриксом, могут активировать сигнализацию рецепторов факторов роста. Мы обнаружили, что сокультивирование с активированными моноцитами увеличивает экспрессию генов цепей интегринов, ответственных за связывание клеточной мембраны с фибронектином и ламинином ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  и  $\beta 1$ ). С помощью иммуноцитохимии мы показали, что на мембране увеличивается количество цепи  $\beta 1$  интегринина (CD29). Таким образом, увеличение количества рецептора PDGFR- $\beta$  на мембране и его партнеров интегринов, возможно, является причиной стимуляции скорости миграции МСК, сокультивированных с активированными моноцитами.

Таким образом, механизмы, определяющие миграцию МСК в ходе регенерации ткани, включают в себя помимо действия градиентов факторов роста и хемокинов еще и взаимодействие с внеклеточным матриксом. Наша работа показала, что воспалительные факторы, секретруемые в зоне воспаления активированными моноцитами, способны модифицировать свойства МСК жировой ткани, активируя механизмы, ответственные за клеточную миграцию. Полученные нами данные указывают, что активированные моноциты стимулируют миграцию МСК за счет стимуляции PDGF-зависимых механизмов как прямо через увеличение экспрессии рецептора PDGFR- $\beta$ , так и опосредованно за счет увеличения взаимодействия интегринов с фибронектином.

Авторы выражают глубокую благодарность сотруднику кафедры биохимии и молекулярной медицины ФФМ МГУ М. Н. Балацкой за неоценимую помощь в оформлении иллюстраций.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Ведущие научные школы Российской Федерации» (НШ-2392.2012.7).

### Список литературы

- Vorotnikov A. B. 2011. Хемотаксис: движение, направление, управление. Успехи биол. химии. 51 : 335—400. (Vorotnikov A. V. 2011. Chemotaxis: movement, direction, control. Biochemistry (Moscow). 76 (13) : 1528—1555.)
- Кочегура Т. Н., Шаронов Г. В., Сысоева В. Ю., Оленев А. С., Парфенова Е. В., Ткачук В. А. 2011. Влияние липопротеидов низкой плотности на мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани. Докл. РАН. 441 (5) : 714—717. (Kochegura T. N., Sharonov G. V., Syssoeva V. Y., Olenev A. S., Parfyonova Y. V., Tkachuk V. A. 2011. The effect of low-density lipoproteins on mesenchymal stromal cells of adipose tissue. Doklady Biol. Sci. 441 (1) : 363—366.)
- Anton K., Banerjee D., Glod J. 2012. Macrophage-associated mesenchymal stem cells assume an activated, migratory, pro-inflammatory phenotype with increased IL-6 and CXCL10 secretion. PLoS ONE. 7 (4) : e35036.
- Ball S. G., Shuttleworth C. A., Kielty C. M. 2009. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization. Exp. Opin. Biol. Ther. 10 : 57—71.
- Brown B. N., Ratner B. D., Goodman S. B., Amar S., Badylak S. F. 2012. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. Biomaterials. 33 : 3792—3802.
- Chen P.-M., Yen M.-L., Liu K.-J., Sytwu H.-K., Yen B. L. 2011. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. J. Biomed. Sci. 18 : 49.
- De Donatis A., Comito G., Buricchi F., Vinci M. C., Parenti A., Caselli A., Camici G., Manao G., Ramponi G., Cirri P. 2008.



- Proliferation Versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. *J. Biol. Chem.* 283 : 19 948—19 956.
- 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. *Cytherapy.* 8 : 315—317.
- Goren I., Allmann N., Yegorov N., Schurmann C., Linke A., Holdener M., Waisman A., Pfeilschifter J., Frank S. 2009. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme m-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Amer. J. Pathol.* 175 : 132—147.
- Horwitz E. F., Dominici M. 2008. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? *Cytherapy.* 10 : 771—774.
- Huttenlocher A., Horwitz A. R. 2011. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 3 : doi: 10.1101/cshperspect.a005074.
- Keating A. 2012. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 10 : 709—716.
- Kim S.-H., Turnbull J., Guimond S. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* 209 : 139—151.
- Kollar K., Cook M., Atkinson K., Brooke G. 2009. Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction. *Int. J. Cell Biol.* 904682. doi: 10.1155/2009/904682.
- Lee M. M. K., Chui R. K. S., Tam I. Y. S., Lau A. H. Y., Wong Y. H. 2012. CCR1-mediated STAT3 tyrosine phosphorylation and CXCL8 expression in THP-1 macrophage-like cells involve pertussis toxin-insensitive G $\alpha$ 14/16 signaling and IL-6 release. *J. Immunol.* 189 : 5266—5276.
- Liu Z.-J., Zhuge Y., Velazquez O. C. 2009. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 106 : 984—991.
- Miyamoto S., Teramoto H., Gutkind J. S., Yamada K. M. 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* 135 : 1633—1642.
- Monaco J. L., Lawrence W. T. 2003. Acute wound healing an overview. *Clin Plast Surg.* 30 : 1—12.
- Moro L., Venturino M., Bozzo C., Silengo L., Altruda F., Beguinot L., Tarone G., Defilippi P. 1998. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 17 : 6622—6632.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284 : 143—147.
- Ponte A. L., Marais E., Gallay N., Langonné A., Delorme B., Hérault O., Charbord P., Domenech J. 2007. The *in vitro* migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells.* 25 : 1737—1745.
- Qin Z. 2012. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis.* 221 : 2—11.
- Rasmusson I. 2006. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 312 : 2169—2179.
- Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T., Melikhova V., Tsokolaeva Z., Sysoeva V., Tkachuk V. A., Parfyonova Y. 2009. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue Eng. Part A.* 15 : 2039—2050.
- Siegbahn A., Hammacher A., Westermark B., Heldin C. H. 1990. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J. Clin. Invest.* 85 : 916—920.
- Spaeth E., Klopp A., Dembinski J., Andreeff M., Marini F. 2008. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 15 : 730—738.
- Veevers-Lowe J., Ball S. G., Shuttleworth A., Kielty C. M. 2011. Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin-mediated activation of PDGFR- $\beta$  and potentiation of growth factor signals. *J. Cell Sci.* 124 : 1288—1300.
- Wang J. F., Zhang X.-F., Groopman J. E. 2001. Stimulation of  $\beta$ 1 integrin induces tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration. *J. Biol. Chem.* 276 : 41 950—41 957.
- Welf E. S., Haugh J. M. 2011. Signaling pathways that control cell migration: models and analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: systems biology and medicine.* 3 : 231—240.
- Werner S., Grose R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83 : 835—870.
- Wight T. N., Kinsella M. G., Keating A., Singer J. W. 1986. Proteoglycans in human long-term bone marrow cultures: biochemical and ultrastructural analyses. *Blood.* 67 : 1333—1343.
- Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 4279—4295.
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7 : 211—228.

Поступила 2 XII 2013

#### CHARACTERISTICS OF MIGRATION OF ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS AFTER CO-CULTIVATION WITH ACTIVATED MONOCYTES *IN VITRO*

O. A. Grigoryeva,<sup>1</sup> \* I. V. Korovina,<sup>1</sup> B. Sh. Gogia,<sup>2</sup> V. Yu. Sysoeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University and <sup>2</sup> Institute of Surgery named after A. V. Vishnevsky, Moscow;  
\*e-mail: go.grigorievaolga@gmail.com

Mesenchymal stromal cells (MSC) are considered to be promising tool of regenerative medicine. Migration of MSC toward damaged inflammatory site is essential for physiological tissue repair. Therefore we studied modifications of migratory features of adipose tissue derived MSC (AT-MSC) after co-cultivation with activated monocytes derived from THP-1 cell line. As a result, we have observed an increased migration rate of AT-MSC *in vitro* in the absence of chemoattractant gradient as well as toward the gradient of PDGF BB (platelet-derived growth factor BB), which is well known chemoattractant for the cells of mesenchymal origin. Furthermore, the rate of directional AT-MSC migration through fibronectin was also increased. We have established that signaling from PDGFR $\beta$  which is activated through binding of integrin receptors with extracellular matrix may be possible way to stimulate cellular migration under simulated inflammatory conditions.

**Key words:** mesenchymal stromal cells, cell migration, inflammation, PDGFR- $\beta$ , integrines.