

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ ОДНОГО ДОНОРА

© И. В. Воронкина,<sup>1</sup> Л. В. Смагина, Т. А. Крылова, А. С. Мусорина, Г. Г. Полянская

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

<sup>1</sup>электронный адрес: voronirina@list.ru

Подтверждена способность линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга (FetMSC) и зачатка конечности (M-FetMSC) раннего эмбриона человека и полученных из них клеточных сфероидов, дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлениях. Показано наличие активностей ММП-9, ММП-2 и ММП-1 в процессе этих дифференцировок в обеих линиях. Сравнительный анализ динамики активностей этих ММП в течение 12 сут в процессе адипогенной и остеогенной дифференцировки показал межлинейные различия, а также различия между монослойными культурами (2D) и клеточными сфероидами (3D). Показана прямая корреляция между уровнем адипогенной дифференцировки и уровнем активности желатиназ ММП-9 и ММП-2 в обеих линиях при 2D- и 3D-культивировании. Так, низкий уровень адипогенной дифференцировки в линии M-FetMSC (2D) соответствует сниженной активности ММП-9 и ММП-2, а повышение уровня дифференцировки (3D) приводит к значительному повышению активности обеих протеиназ. Противоположный эффект обнаружен при анализе активности ММП-1: низкий уровень адипогенной дифференцировки в линии M-FetMSC (2D) соответствует повышенной активности ММП-1, а увеличение уровня адипогенной дифференцировки (3D) приводит к снижению ММП-1. Наблюдаемая динамика активностей ММП-9 и ММП-1 не связана с уровнем остеогенной дифференцировки, который неизменен во всех вариантах, тогда как активность ММП-2 и степень остеогенной дифференцировки не изменяются в обеих линиях при 2D- и 3D-культивировании. Результаты позволяют предположить разное участие ММП в процессах дифференцировки МСК. Полученные различия между активностями ММП в процессе дифференцировки линий FetMSC и M-FetMSC могут быть связаны как с влиянием разного исходного микроокружения, так и с разными свойствами ВКМ в 2D- и 3D-культурах.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые клетки, дифференцировка, матриксные металлопротеиназы.

**Принятые сокращения:** ВКМ — внеклеточный матрикс, ММП — матриксная металлопротеиназа, МСК — мезенхимные стволовые клетки.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека, выделенные из разных тканей, могут относительно безопасно использоваться в клеточной терапии, а также в качестве тест-систем для фармацевтических исследований (Zhang et al., 2012; Sharma et al., 2015). Каждая вновь полученная мультипотентная линия МСК должна иметь ряд характеристик, которые, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, подтверждают статус МСК (Dominici et al., 2006). К таким характеристикам относятся: адгезивность к культуральному пластику; активная пролиферация; экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD44, HLA ABC и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA DR; способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. Несмотря на огромный интерес к МСК, остается много вопросов, связанных, в частности, с механизмами мультипотентной дифференцировки. В настоящее время ведутся обширные исследования, фокуси-

рующиеся на идентификации факторов, принимающих участие в регуляции и контроле специфических свойств МСК, позволяющих их использовать в регенеративной медицине.

Одним из направлений, исследующих функциональные особенности МСК, является выяснение роли матриксных металлопротеиназ (ММП) в процессах их дифференцировки. ММП представляют семейство Ca- и Zn-зависимых эндопептидаз, которые регулируют активность многих биологических молекул, расщепляя или блокируя их. ММП и их специфические ингибиторы влияют на такие фундаментальные клеточные процессы, как пролиферация, апоптоз, дифференцировка и др. ММП участвуют в ремоделировании тканей и развитии органов, специфически модулируя сигнальные пути посредством взаимодействия с субстратами разной природы, а также путем перестройки внеклеточного матрикса (ВКМ) (Page-McCaw et al., 2007; Kessenbrock et al., 2010). ВКМ подде-

жит постоянно обновлению за счет процессов синтеза и деградации. Основную роль в этих процессах играют ММП, способные расщеплять все белки ВКМ (Nagase, Woessner, 1999). ММП синтезируются клетками разных типов — фибробластами, кератиноцитами, фагоцитами, лимфоцитами и трансформированными клетками. Все члены семейства ММП обладают общими характерными чертами: они имеют общие участки аминокислотной последовательности, синтезируются в виде неактивных проферментов и включают в себя цинк в качестве кофактора. По субстратной специфичности ММП объединены в следующие подсемейства: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины и ММП мембранного типа (Nagase, Woessner, 1999).

ВКМ является одним из важнейших регуляторов клеточных процессов. Регуляция процессов дифференцировки осуществляется через взаимодействие белков ВКМ, вырабатываемых самими клетками, с ММП (Kessenbrock et al., 2010).

Активное участие ММП в регуляции дифференцировки МСК в разных направлениях убедительно проанализировано в ряде работ (Mannello et al., 2006; Ghajar et al., 2010; Schneider et al., 2010; Polacek et al., 2011; Sillat et al., 2012; Ould-Yahoui et al., 2013; Sassoli et al., 2014; Tratwal et al., 2015). Эти исследования проведены на МСК, полученных из разных тканей и от разных доноров. Но нам неизвестны данные о сравнении активности ММП при дифференцировке МСК, полученных от одного донора, но из разных тканей. Ранее нами были получены две линии МСК из костного мозга и из зачатка конечности из раннего эмбриона человека. Несмотря на подтверждение статуса МСК для обеих линий, обнаружен ряд различий между ними, связанных с ростовыми характеристиками и с дифференцировочным потенциалом (Крылова и др., 2014). Полученные результаты позволяют предположить влияние разного микроокружения, в котором находились клетки в организме до перевода их в культуру. В связи с этим существенно провести сравнительное исследование активности ММП в генетически однородных, но находящихся в разном микроокружении МСК.

В настоящее время широко исследуются клеточные сфероиды, полученные из МСК разного происхождения. Условия 3D-культивирования МСК гораздо ближе к физиологическим условиям тканей в организме, чем монослойное (2D) культивирование. В клеточных сфероидах усилены межклеточные взаимодействия, а также взаимодействия клеток с ВКМ, что расширяет возможности изучения природных клеточных свойств, таких как пролиферация, дифференцировка, апоптоз и др. в отсутствие экзогенных (искусственных) матриксов, которые могут препятствовать проявлению этих свойств (Baraniak, McDevitt, 2012). Клеточные сфероиды МСК обладают усиленным противовоспалительным действием, увеличенным дифференцировочным потенциалом, увеличенной экспрессией ряда цитокинов и плюрипотентных генов и поэтому являются перспективным объектом как для исследования основ органогенеза, так и для использования их в регенеративной медицине (Alimperti et al., 2014; Bogdanova-Jatniece et al., 2014; Guo et al., 2014; Li et al., 2015).

В предыдущей работе нами были получены клеточные сфероиды из монослойных линий МСК — FetMSC и M-FetMSC. Сравнительный анализ характеристик этих линий при 2-мерном (2D) культивировании в монослое и 3-мерном (3D) в сфероидах подтверждает статус МСК

для клеточных сфероидов и свидетельствует, по-видимому, о частичном расширении их дифференцировочного потенциала по сравнению с монослойными культурами (Крылова и др., 2015).

Учитывая, что ММП являются важнейшими регуляторами клеточных процессов, в частности дифференцировки, считаем необходимым провести сравнительное исследование активности ММП в клеточных линиях, культивирующихся в 2D- и 3D-условиях. Интерес к такому исследованию связан еще и с тем, что характер взаимодействия клеток с ВКМ различается между монослойной культурой и сфероидом, а ММП участвуют в процессах ремодулирования ВКМ.

В связи с этим задача настоящей работы заключалась в сравнительном анализе экспрессии ММП в двух линиях МСК, выделенных из разных тканей одного генетического индивидуума, при культивировании двумя способами — в монослое (2D) и в клеточных сфероидах (3D). Изучали экспрессию коллагеназы ММП-1 и желатиназы ММП-2 и ММП-9, которые активно принимают участие в процессах дифференцировки в остеогенном и адипогенном направлениях (Mannello et al., 2006).

## Материал и методика

В работе использовали полученные в ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) неиммортиализованные клеточные линии FetMSC и M-FetMSC. Методы получения и характеристики этих линий и клеточных сфероидов описаны ранее (Крылова и др., 2012, 2014, 2015). Культивирование клеточных сфероидов (3D-условия) и клеток линий FetMSC и M-FetMSC (2D-условия) проводили в среде DMEM/F12 (Gibco-Invitrogene, США), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Hyclone, США), в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C и влажности 90 %. Клеточные линии использовали на 6-м пассаже после получения, а клеточные сфероиды — через 48 ч после их образования.

Направленная дифференцировка МСК. Направленную дифференцировку в адипогенном и остеогенном направлениях проводили по модифицированному методу (Reyes et al., 2001). Для направленной адипогенной дифференцировки клеточные сфероиды и клетки FetMSC и M-FetMSC в концентрации 10 тыс. кл./см<sup>2</sup> высевали в среду следующего состава: 90 % α-MEM, 10 % FBS, 10<sup>-8</sup> М дексаметазона, 50 мкг/мл аскорбата натрия, 1-кратный раствор ITS, включающий в себя инсулин, трансферрин, селенит натрия (Invitrogen, США) и 1-кратный LA-BSA, содержащий 1 мкг/мл линолевой кислоты в 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA). Обработку клеток проводили в течение 12 сут. Среду меняли через каждые 3—4 сут. Для выявления дифференцировки в адипогенном направлении клетки промывали PBS без ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, фиксировали в метаноле в течение 2 мин при -20 °C. Фиксированные клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали красным масляным (Oil Red O) в течение 10 мин. Окрашенные клетки промывали 50%-ным этанолом, затем дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

В качестве маркера остеогенной дифференцировки исследовали распределение солей кальция во внеклеточном матриксе клеток. Для направленной остеогенной дифференцировки клеточные сфероиды и клетки линий

FetMSC и M-FetMSC (2D) в той же концентрации высевали в индукционную среду следующего состава: 90 %  $\alpha$ -MEM (Биолот, Россия), 10 % FBS, 10 mM  $\beta$ -глицерофосфата натрия (Sigma, США),  $10^{-8}$  М дексаметазона (Sigma, США) и 50 мкг/мл аскорбата натрия (ICN, США). Дифференцировку индуцировали в течение 12 сут. Среду меняли через каждые 3—4 сут. Выявление в межклеточном пространстве нерастворимых солей кальция (реакцию von Kossa) проводили следующим образом. Клетки фиксировали в метаноле 2 мин при (20 °С, окрашивали 1 ч 2%-ным раствором  $\text{AgNO}_3$  (Вектон, Россия) под лампой мощностью 60 Вт. Окрашенные клетки промывали дистиллированной водой и на 5 мин помещали в 2.5%-ный раствор тиосульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ). Затем окрашенные клетки снова промывали водой и высушивали.

Контролем для всех экспериментов служило культивирование в обычной ростовой среде в течение 3 сут. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия).

Зимография. Наличие и активность ММП-1, ММП-2 и ММП-9 в образцах среды, кондиционированной культивируемыми клетками, оценивали методом зимографии на желатине и на казеине. Внесение клеток в индукционную среду считали началом эксперимента (0 сут). Образцы отбирали через 0, 3, 6 и 12 сут от начала эксперимента. Для проведения зимографии пробы среды готовили, смешивая с буфером для проб по Лэмбли, не содержащим меркаптоэтанол, без нагревания, инкубировали смесь в течение 20 мин при комнатной температуре. Гель для проведения электрофореза (10 % акриламида) полимеризовали вместе с раствором желатина или казеина. Гель содержал 1 мг/мл желатина (для идентификации ММП-2 и ММП-9) или 0.5 мг/мл казеина (для идентификации ММП-1). Далее пробы наносили на гель в количестве, соответствующем 20 мкг белка на дорожку, и разделяли с помощью электрофореза. После 2-кратного промывания по 15 мин в 2.5%-ном растворе тритона X-100 гель инкубировали в течение 12 ч в буферном растворе (50 mM Трис-НСI и 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4). Затем гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим (Sigma, США). Присутствие ММП, расщепляющих субстрат, определяли по наличию неокрашенных полос на геле. Для количественного анализа ММП-1, ММП-2 и ММП-9 гели сканировали и полученные изображения обрабатывали с помощью программы QuantiScan (версия 3.0), величину активности ММП получали в усл. ед., принятых в программе QuantiScan (произведение числа окрашенных пикселей и интенсивности их окраски). Количество белка в пробе определяли по методу Брэдфорда. Для выявления положения зон, соответствующих ММП-2 и ММП-9, при зимографии использовали среду, кондиционированную фибробластами линии HT-1080, содержащую проформы и активные формы ММП-2 и ММП-9 (Oliver et al., 1998). Принадлежность зон ММП идентифицировали по специфическому ингибированию активности протеаз ЭДТА и ингибитором GM6001 (Calbiochem, США).

Изменения уровней активности для каждой точки выражали в процентах относительно уровня соответствующей ММП в исходной дифференцировочной среде без клеток (принято за 100 %). На графиках приведены средние значения и их ошибки по 3 измерениям в каждой точке. Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.01$ .

## Результаты и обсуждение

При 2D- и 3D-культивировании клеток в обычной ростовой среде (без индукции дифференцировки) признаков адипогенной дифференцировки не обнаруживается (рис. 1, *a, в, д, ж*). Культивирование клеток в адипогенной среде способствовало образованию кластеров адипоцитов, показанных с помощью окрашивания красителем Oil Red O. В отличие от клеток FetMSC клетки M-FetMSC менее активно формируют жировую ткань при 2D-культивировании после 12-суточной индукции дифференцировки (рис. 1, *б, з*), что подтверждает результат более ранних наблюдений (Крылова и др., 2014, 2015)

Проведение ряда повторных экспериментов показало, что в клеточных сфероидах M-FetMSC адипогенная дифференцировка идет более активно, чем в соответствующей монослойной культуре, и совпадает по интенсивности с 2D- и 3D-культурами линии FetMSC (рис. 1, *б, з, е, з*).

Анализировали активность ММП-1, ММП-2 и ММП-9 в кондиционированных клетками индукционных средах в процессе адипогенной и остеогенной дифференцировки в течение 12 сут в нескольких временных точках, поскольку рядом авторов показано нарастание количества дифференцированных клеток в течение именно этого времени (Sillat et al., 2012; Alves et al., 2014; Wang et al., 2015).

Необходимо отметить, что длительное культивирование клеток невозможно без сыворотки. Поэтому в качестве контролей для обоих вариантов дифференцировки были взяты соответствующие исходные индуцирующие среды, содержащие сыворотку, и уровни активности ММП рассчитывали относительно таких сред.

Активность ММП-9 во всех исследованных точках ниже уровня ее в индукционной среде в начальный момент, т. е. перед контактом среды и клеток. Этот уровень активности ММП-9 обусловлен наличием в ростовой среде FBS и принят за 100 %. В процессе адипогенной дифференцировки при культивировании в 2D-условиях через 6 сут активность ММП-9 исчезает в обеих линиях (рис 2, *a*), а до этого времени уровень ММП-9 в линии FetMSC выше, чем в M-FetMSC ( $86 \pm 2.1$  и  $42 \pm 1.6$  % соответственно  $P < 0.01$ ). Динамика активности этой ММП в клеточных сфероидах отличается от монослойных культур. Так, через 6 сут дифференцировки наблюдается значительная активность в клеточных сфероидах линии M-FetMSC, тогда как в 2D-культуре этих клеток она отсутствует. Активность ММП-9 в сфероиде исчезает на более позднем сроке дифференцировки — через 12 сут. Такая же картина имеет место при дифференцировке сфероидов и монослойной культуры линии FetMSC. Активность ММП-9 сфероидов линии M-FetMSC меньше, чем сфероидов линии FetMSC ( $P < 0.01$ ), и составляет на 3-и и 6-е сут  $24 \pm 2.1$  и  $34 \pm 3.0$  % соответственно против  $50 \pm 1.6$  и  $74 \pm 2.4$  % соответственно у сфероидов FetMSC. Соответствующие изображения, демонстрирующие активность ММП-9, приведены на рис. 2, *a'*. Уровень адипогенной дифференцировки постепенно возрастает в течение 12 сут для всех вариантов, при этом на всех сроках уровень дифференцировки в линии M-FetMSC снижен по сравнению с FetMSC. Если сопоставить результаты, полученные для активности ММП-9, с результатами, полученными при адипогенной дифференцировке (рис. 1, *a—з*), то можно видеть, что в монослойных культурах линии M-FetMSC

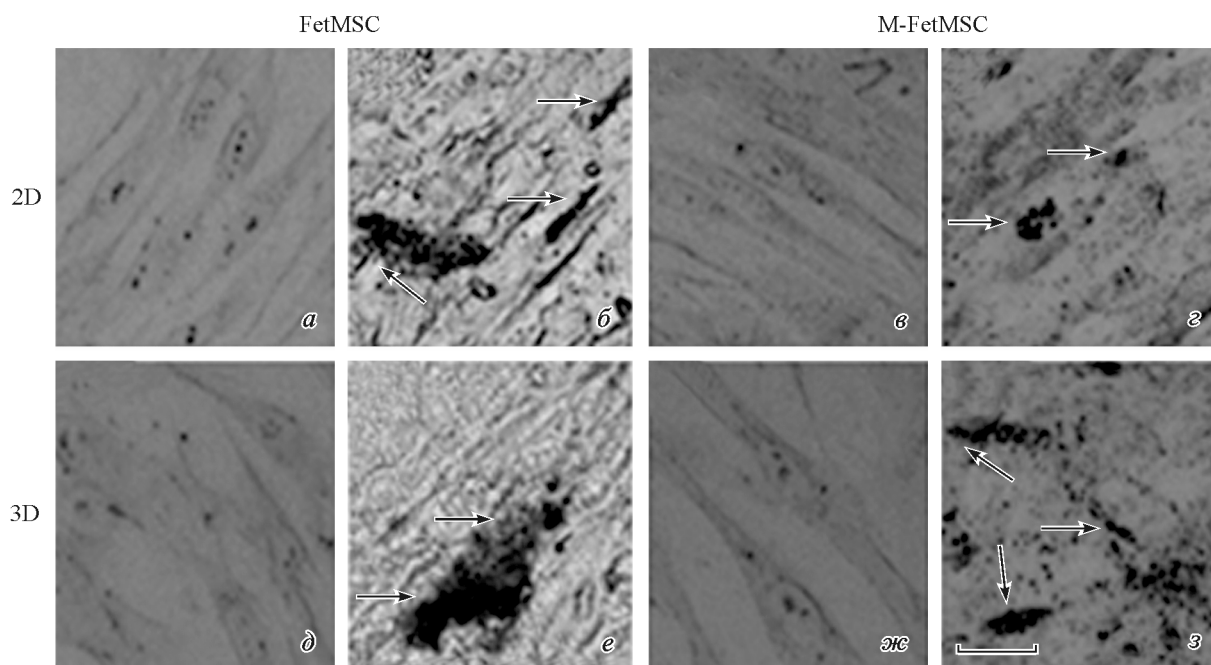


Рис. 1. Дифференцировка в адипогенном направлении монослойных культур (2D) и клеточных сфероидов (3D) линий FetMSC и M-FetMSC.

*a, в, д, ж* — культивирование клеток в неиндукционной среде (контроль); *б, г, е, з* — 12 сут культивирования в индукционной среде (2D и 3D). Окрашивание клеток масляным красным (*стрелки*) (Oil Red O). Масштабный отрезок — 25 мкм.

низкий уровень адипогенной дифференцировки коррелирует со сниженной активностью ММП-9 (3-и сут). В клеточных сфероидах M-FetMSC наблюдается усиление адипогенной дифференцировки по сравнению с этими клетками в 2D-условиях, которое сопровождается существенным повышением активности ММП-9 (3-и и 6-е сут). Существенно, что через 6 или 12 сут культивирования, несмотря на разный уровень дифференцировки клеток FetMSC и M-FetMSC при 2D-культивировании и сходный уровень дифференцировки в клеточных сфероиде этих линий, активность ММП-9 исчезает во всех случаях. Наблюдаемая динамика активности ММП-9, возможно, связана с ремодуляцией ВКМ этими клетками. Отсутствие активности ММП-9 через 6 и 12 сут может свидетельствовать об оптимальном состоянии ВКМ на этих сроках, не требующем ремодуляции ВКМ в процессе дальнейшей дифференцировки.

Активность ММП-2 при адипогенной дифференцировке в течение 12 сут в монослойных 2D-культурах FetMSC и M-FetMSC различается (рис. 2, б). Так, активность ММП-2 в процессе дифференцировки в течение 12 сут в клетках FetMSC находится на одном уровне, близком к активности в индуцированной среде без клеток (контроль), и составляет через 3 и 6 сут  $103 \pm 4.6$  и  $105 \pm 4.7\%$  соответственно. А у клеток FetMSC активность ММП-2 снижается и составляет через 3 и 6 сут  $79 \pm 2.1$  и  $81 \pm 2.2\%$  соответственно ( $P < 0.01$ ). Но наиболее значительное снижение активности ММП-2 у клеток M-FetMSC наблюдается через 12 сут ( $105 \pm 4.7$  на 6-е сут и  $39 \pm 1.1\%$  на 12-е сут,  $P < 0.01$ ). В клеточных сфероиде обеих линий уровни активности ММП-2 при дифференцировке в течение 12 сут близки (рис. 2, б'). Соответствующие зимограммы, демонстрирующие активность ММП-2, приведены на рис. 2, б'. При сопоставлении результатов измерения уровней активности ММП-2 с

результатами, полученными с помощью окрашивания клеток красителем Oil Red O на 12-е сут адипогенной дифференцировки (рис. 1, а—з) можно видеть, что низкий уровень адипогенной дифференцировки в монослойной культуре линии M-FetMSC (по сравнению с FetMSC) соответствует сниженной активности ММП-2 у них же, а повышение уровня дифференцировки в клеточных сфероиде приводит к значительному повышению активности ММП-2.

Наличие активности ММП-2, так же как и ММП-9, в процессе адипогенной дифференцировки МСК показано и обсуждено в ряде работ (Brown et al., 1997; Bouloumie et al., 2001; Mannello et al., 2006; Sillat et al., 2012). Авторы полагают, что ММП-2 и ММП-9 играют ключевую роль в адипогенной дифференцировке МСК через ремодуляцию ВКМ. Наличие постоянной активности ММП-2 (в отличие от ММП-9) на всех исследованных сроках у всех клеток свидетельствует о происходящей ремодуляции ВКМ в процессе дифференцировки.

Ранее нами было показано, что уровень активности ММП в среде культивирования в отличие от количества ММП в той же среде может зависеть, например, от присутствия антиоксидантов, ингибирующих не экспрессию, а активность ММП, что может влиять на синтез коллагена I и других компонентов ВКМ (Воронкина и др., 2008). Некоторые компоненты дифференцировочных сред также влияют на синтез и секрецию ММП. Например, дексаметазон подавляет активность ММП (Pross et al., 2002) в среде, так же действует и инсулин (Dandona et al., 2003). В то же время аскорбат натрия, входящий в состав таких сред, способствует синтезу коллагена I и ММП (Philips et al., 2007). Возможно, именно соотношение между компонентами, ингибирующими и стимулирующими активность ММП в разных дифференцировочных средах, и приводит к желаемой направленности дифференцировки.

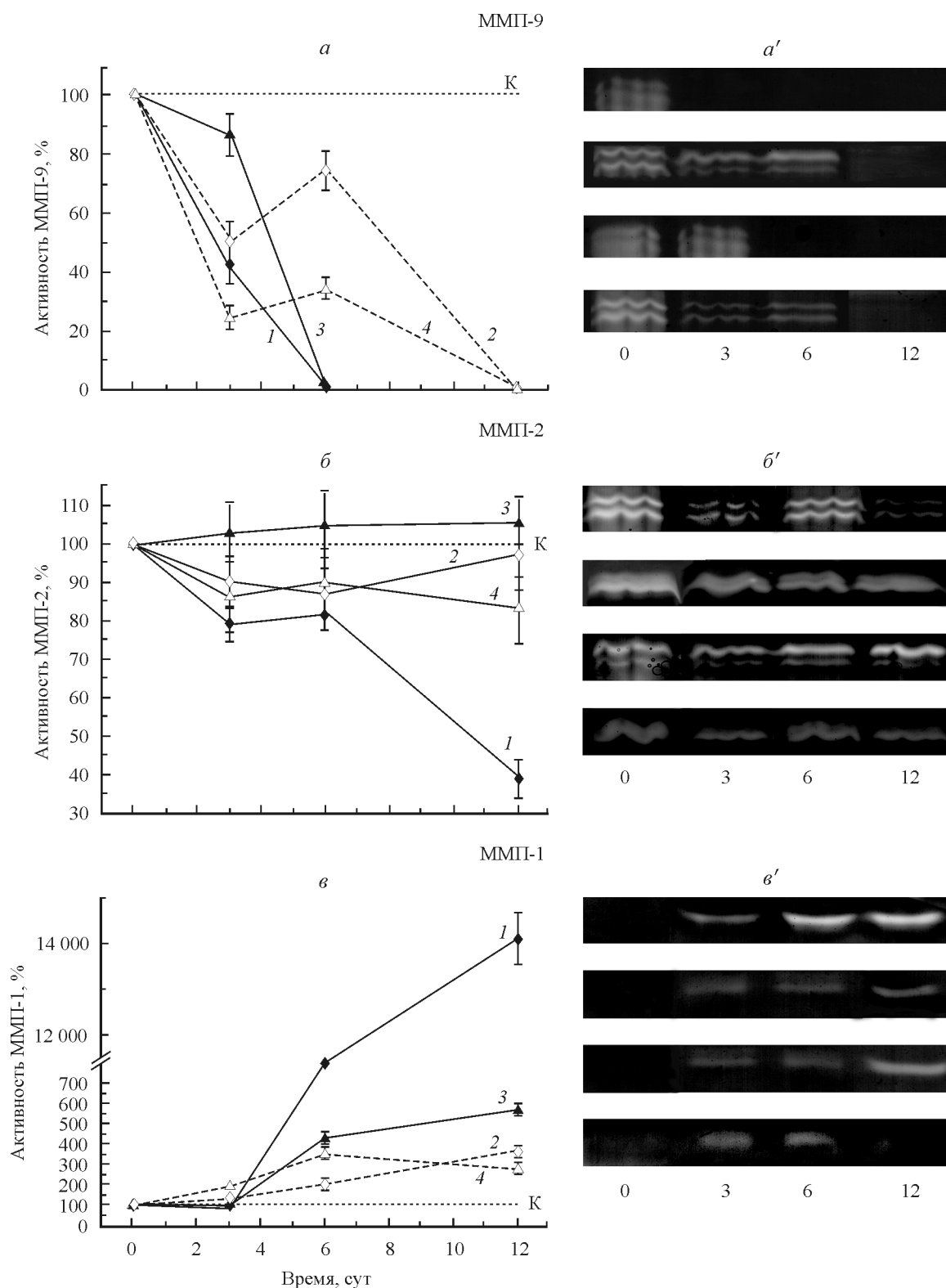


Рис. 2. Активность металлопротеиназ ММП-9, ММП-2 и ММП-1 в процессе адипогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека линий FetMSC и M-FetMSC и полученных из них клеточных сфероидов.

*a—в* — изменения активности ММП-9, ММП-2 и ММП-1 соответственно в течение 12 сут от начала эксперимента; *a'—в'* — зимোগраммы соответствующих ММП. 1 — M-FetMSC (2D), 2 — M-FetMSC (3D), 3 — FetMSC (2D), 4 — FetMSC (3D). Здесь и на рис. 4 : активность ММП рассчитывали по данным денситометрии, выражая в % от начала эксперимента (0); К — исходная индукционная среда. На графиках приведены средние значения и их ошибки по трем измерениям в каждой точке.

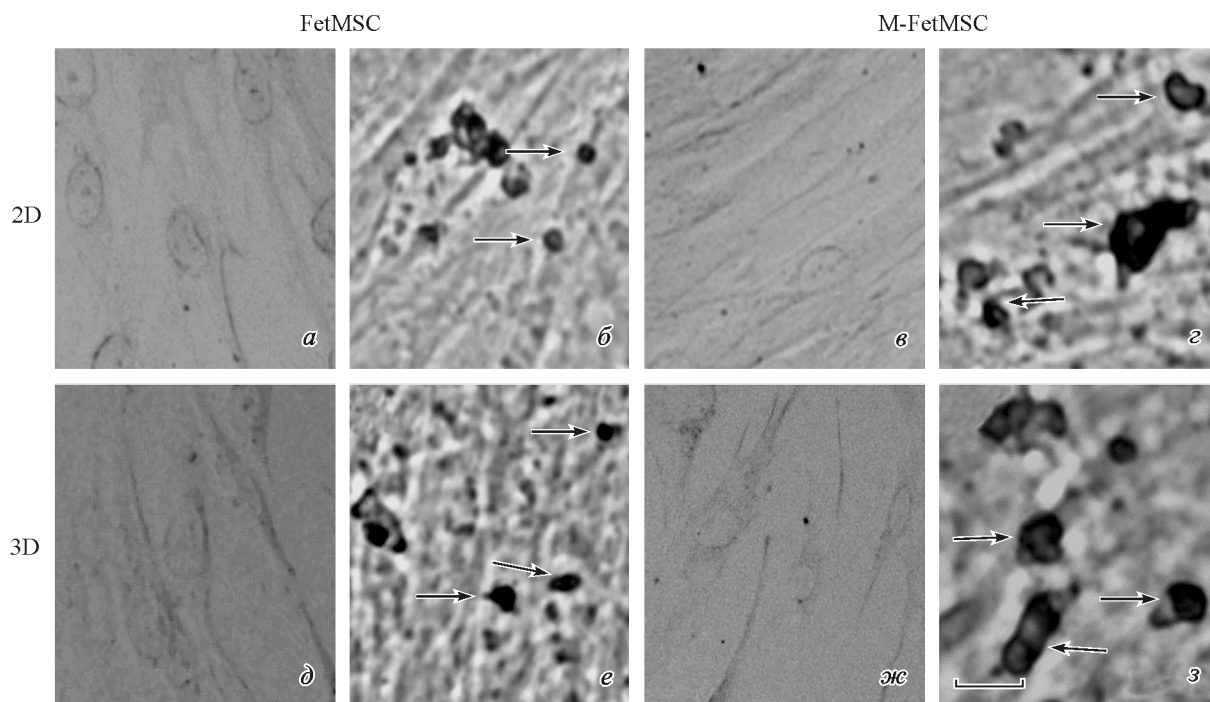


Рис. 3. Дифференцировка в остеогенном направлении монослойных культур (2D) и клеточных сфероидов (3D) линий FetMSC и M-FetMSC.

*a, в, д, ж* — культивирование клеток в неиндукционной среде (контроль); *б, з, е, з* — 12 сут культивирования в индукционной среде клеток линий FetMSC и M-FetMSC (2D и 3D). Формирование минеральных комплексов (*стрелки*) в межклеточном пространстве по реакции Van Kossa. Масштабный отрезок — 25 мкм.

Активность ММП-1 в исследуемых линиях клеток имеет в процессе адипогенной дифференцировки совершенно иной характер при 2D- и 3D-культивировании (рис. 2, *в*). Необходимо подчеркнуть, что активность ММП-1 в сыворотке практически отсутствует (в отличие от ММП-9 и ММП-2). Через 3 сут после начала дифференцировки в монослойных культурах обеих линий активность ММП-1 резко повышается и не снижается в течение 12 сут. Но в клетках линии M-FetMSC она выше, чем в клетках FetMSC ( $P < 0.01$ ). В клеточных сфероидах активность ММП-1 снижена по сравнению с монослойной культурой. Причем в клетках M-FetMSC различия заметны уже через 6 и 12 сут ( $P < 0.01$ ), тогда как в клетках FetMSC заметное снижение активности ММП-1 в сфероиде наблюдается только через 12 сут ( $P < 0.01$ ). Таким образом, активность ММП-1 значительно повышена в 2D-культуре M-FetMSC, имеющей низкий уровень адипогенной дифференцировки, в отличие от активности ММП-1 в 2D-культуре линии FetMSC (рис. 1, *a–з*). А при увеличении уровня адипогенной дифференцировки в сфероиде M-FetMSC активность ММП-1 существенно снижается. Зимограммы, демонстрирующие активность ММП-1, приведены на рис. 2, *в'*. Эти результаты свидетельствуют об обратной корреляции между уровнем адипогенной дифференцировки и активностью ММП-1 в отличие от прямой корреляции в случае с активностью ММП-9 и ММП-2. По-видимому, это связано с участием ММП в процессах дифференцировки этих клеток.

Указанием на то, что ММП могут принимать участие в метаболизме адипоцитов, могут служить данные, полученные при изучении клеток-прекурсоров адипоцитов 3T3L1 мыши. В процессе адипоцитарной дифференцировки клеток 3T3L1 нарастает экспрессия ММП-2, -3, -9,

-13 и -14. При этом ММП-1 не экспрессировалась или ее экспрессия снижалась в процессе адипогенеза (Bernlohr et al., 1984; Alexander et al., 2001; Croissant et al., 2002; Chavey et al., 2003). Показано также, что зрелые жировые клетки и адипоциты в культуре секретируют желатиназы ММП-2 и ММП-9, а их активность возрастает в ходе адипоцитарной дифференцировки (Brown et al., 1997). Эти данные позволяют предположить неодинаковую роль разных ММП в процессе дифференцировки адипоцитов.

Анализ остеогенной дифференцировки. Для всех вариантов культивирования клеток (2D и 3D) через 12 сут в остеогенной среде происходит активное формирование минеральных комплексов (нерастворимых солей кальция в межклеточном пространстве) (рис. 3, *б, з, е, з*). Культивирование клеток обеих линий в вариантах 2D и 3D в обычной ростовой среде (без индукции дифференцировки) не показывает признаков остеогенной дифференцировки (рис. 3, *a, в, д, ж*). Тем не менее активность ММП-9 существенно колеблется в процессе культивирования в индукционной среде. Необходимо подчеркнуть, что активность ММП-9 во всех исследованных точках ниже уровня ее в индукционной среде в начальный момент, т. е. перед началом действия среды, из-за присутствия в среде сыворотки, содержащей активные ММП (рис. 4, *a*). Колебания активности ММП-9 наиболее выражены через 6 и 12 сут. Так, в клетках линии FetMSC в вариантах 2D и 3D через 6 и 12 сут дифференцировки активность ММП-9 снижается до нулевых значений. Через 12 сут наблюдаются различия между монослойными культурами и клеточными сфероидами в линии M-FetMSC, где в 3D-культуре активность ММП-9 падает до нуля, а в 2D-культуре остается на достаточно высоком уровне. В сфероиде FetMSC активность

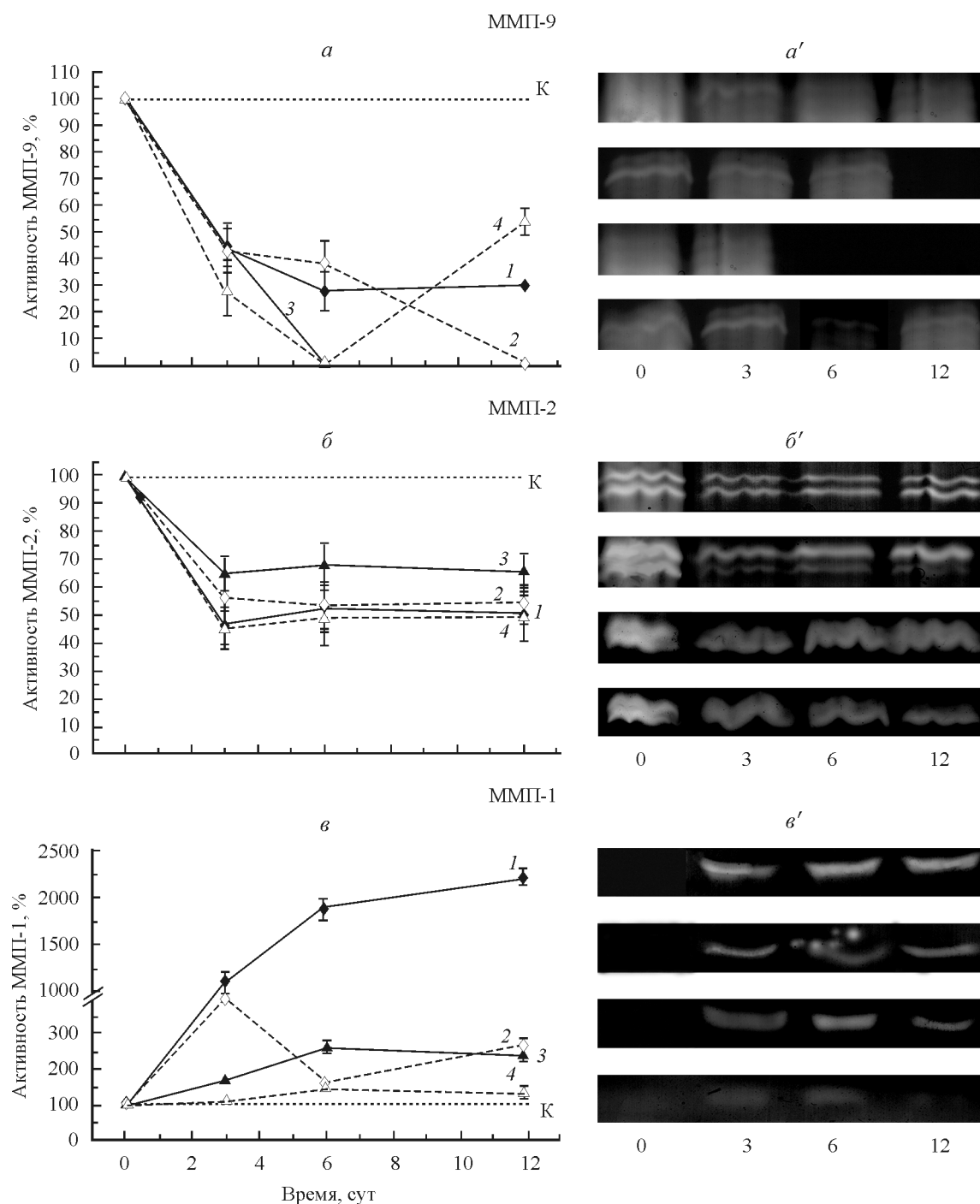


Рис. 4. Активность металлопротеиназ ММП-9, ММП-2 и ММП-1 в процессе остеогенной дифференцировки МСК человека линий FetMSC и M-FetMSC и полученных из них клеточных сфероидов.

*a—v* — изменения активности ММП-9, ММП-2 и ММП-1 соответственно в течение 12 сут от начала эксперимента; *a'—v'* — зимограммы соответствующих ММП. 1 — M-FetMSC (2D), 2 — M-FetMSC (3D), 3 — FetMSC (2D), 4 — FetMSC (3D). К — исходная индукционная среда. На графиках приведены средние значения и их ошибки по трем измерениям в каждой точке.

ММП-9, наоборот, значительно повышается по сравнению с 2D-культурами. Зимограммы, демонстрирующие активность ММП-9, приведены на рис. 4, *a'*. Таким образом, в 2D-культурах и в клеточных сфероидов линий FetMSC и M-FetMSC в ходе остеогенной дифференцировки активность ММП-9 меняется противоположным образом: у клеток FetMSC она повышена в сфероидов, а у M-FetMSC — в монослойной культуре. Это может быть

связано с разным количеством и структурной организацией ВКМ между 2D- и 3D-культурами, а также с различием между самими клеточными сфероидов, полученными из разных тканей. Оно может объясняться влиянием разного микроокружения, в котором находились клетки в организме до перевода их в культуру. Различия между этими линиями по дифференцировочному потенциалу были показаны нами ранее (Крылова и др.,

2014, 2015). Важно подчеркнуть, что разная активность ММП-9 через 12 сут культивирования в индукционной среде не коррелирует с уровнем остеогенной дифференцировки, который неизменен во всех вариантах.

Активность ММП-2 при остеогенной дифференцировке значительно снижается через 3 сут культивирования у всех клеток и далее при культивировании в индукционной среде до 12 сут находится примерно на одном уровне (рис. 4, б). Можно только отметить, что активность ММП-2 через 3 сут у 2D-культуры FetMSC больше, чем у сфероидов этой же линии и чем у клеток M-FetMSC через 3—12 сут ( $P < 0.01$ ). Зимограммы, демонстрирующие активность ММП-2, приведены на рис. 4, б'. Эти данные в целом коррелируют с неизменным уровнем дифференцировки через 12 сут во всех вариантах. Постоянная активность ММП-2 на всех исследованных сроках, как и постоянный уровень адипогенной дифференцировки, может свидетельствовать о необходимости взаимодействия ММП-2 с ВКМ в связи с синтезом и ремодуляцией ВКМ в процессе остеогенной дифференцировки. Показано, что в процессе остеогенной дифференцировки МСК из костного мозга активность ММП-2 снижается, что коррелирует с образованием ВКМ, способного поддерживать нормальное функционирование клеток (Rodriguez et al., 2000). Авторы работы подчеркивают, что ММП, в частности ММП-2, активно участвуют в процессах остеогенной дифференцировки, регулируя миграцию клеток и ремодуляцию ВКМ (Schneider et al., 2010).

Активность ММП-1 при остеогенной дифференцировке. Изменение активности ММП-1 носит иной характер, чем у ММП-9 и ММП-2 при культивировании клеток в 2D- и 3D-условиях. У обеих линий наблюдаются существенные различия между вариантами 2D и 3D (рис. 4, в). Показано, что с началом дифференцировки начинается резкое увеличение активности ММП-1 в монослойной культуре M-FetMSC и что она выше активности ММП-1 в монослойной культуре FetMSC на сроках 3, 6 и 12 сут ( $P < 0.01$ ). Активность ММП-1 в клеточных сфероидах существенно ниже, чем в монослойных культурах. Только на сроке 3 сут активность ММП-1 в сфероидах FetMSC увеличена по сравнению со сфероидами M-FetMSC ( $P < 0.01$ ). Зимограммы, демонстрирующие активность ММП-1, приведены на рис. 4, в'. Активность ММП-1, так же как и ММП-9, через 12 сут культивирования в индукционной среде не коррелирует с уровнем остеогенной дифференцировки, который одинаков для всех вариантов. По-видимому, на протяжении 12 сут продолжают присутствовать процессы, связанные с необходимостью присутствия активности ММП-1, которая участвует в процессе синтеза коллагена I, требуемого для образования костной ткани (Nagase, Woessner, 1999). Но результаты показали, что уровни активности ММП-1 существенно различны для обеих линий.

В заключение следует подчеркнуть, что наблюдаемая динамика активности ММП-9 и ММП-2 в течение 12 сут дифференцировки, безусловно, связана с взаимодействием клеток и индукционной среды, в которой изначально присутствует сыворотка, содержащая эти ММП. Поэтому из наших результатов нельзя сделать однозначный вывод о присутствии и функционировании именно клеточных ММП-9 и ММП-2. Но можно констатировать, что эти ММП независимо от их происхождения необходимы для процессов дифференцировки МСК. Из результатов по ММП-1 можно уверенно утверждать, что имен-

но клеточная ММП-1 сопровождает процесс дифференцировки МСК, так как в индукционной среде она отсутствует.

### Список литературы

- Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Гамалей И. А. 2008. Изменение активности матриксных металлопротеиназ нормальных и трансформированных фибробластов мыши при действии антиоксидантов. Цитология. 50 (10): 877—881. (Voronkina I. V., Kirpichnikova K. M., Smagina L. V., Gamaley I. A. 2007. Changes in matrix metalloproteinases activities in normal and transformed mouse fibroblasts under effect of antioxidants. Tsitologiya. 50 (10) : 877—881.)
- Крылова Т. А., Кольцова А. М., Зенин В. В., Мусорина А. С., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. 54 (1) : 5—16. (Krylova T. A., Koltsova A. M., Zenin V. V., Musorina A. S., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2012. Comparative characteristics of new lines of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells, bone marrow, and foreskin. Tsitologiya. 54 (1) : 5—16.)
- Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Полянская Г. Г. 2015. Характеристика клеточных сфероидов, полученных из линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 57 (7) : 480—490. (Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Poljanskaya G. G. 2015. Cellular spheroids obtained from mesenchymal stem cells derived from bone marrow and limb muscle of early human embryo. Tsitologiya. 57 (7) : 480—490.)
- Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2014. Сравнительные характеристики линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга и мышцы конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 56 (8) : 562—573. (Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2014. Comparative characteristics of mesenchymal stem cell lines derived from bone marrow and muscle of limb of early human embryo. Tsitologiya. 56 (8) : 562—573.)
- Alexander C. M., Selvarajan S., Mudgett J., Werb Z. 2001. Stromelysin—1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. J. Cell Biol. 152 : 693—703.
- Alimperi S., Lei P., Wen Y., Tian J., Campbell A. M., Andreadis S. T. 2014. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. Biotechnol. Prog. 30 : 974—983.
- Alves E. G., Serakides R., Boeloni J. N., Rosado I. R., Ocario N. M., Oliveira H. P., Goes A. M., Rezende C. M. 2014. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. BMC Vet. Res. 10 : 190—198.
- Baraniak P. R., McDevitt T. C. 2012. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. Cell Tissue Res. 347 : 701—711.
- Bernlohr D. A., Angus C. W., Lane M. D., Bolanowski M. A., Kelly T. J. Jr. 1984. Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 81 : 5468—5472.
- Bogdanova-Jatniece A., Berzins U., Kozlovskaya T. 2014. Growth properties and pluripotency marker expression of spontaneously formed three-dimensional aggregates of human adipose-derived stem cells. Int. J. Stem Cells. 7 : 143—152.
- Brown L. M., Fox H. L., Hazen S. A., LaNoue K. F., Rannels S. R., Lynch C. J. 1997. Role of the matrixin MMP-2 in multicellular organization of adipocytes cultured in basement membrane components. Amer. J. Physiol. 272 : C937—C949.
- Bouloumié A., Sengenès C., Portolan G., Galitzky J., Lafontan M. 2001. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9 involvement in adipose differentiation. Diabetes. 50 : 2080—2086.



- Chavey C., Mari B., Monthouel M. N., Bonnafous S., Anglard P., Van Obberghen E., Tartare-Deckert S. 2003. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J. Biol Chem.* 278: 11 888—11 896.
- Croissandeau G., Chretien M., Mbikay M. 2002. Involvement of matrix metalloproteinases in the adipose conversion of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. J.* 364 : 739—746.
- Dandona P., Aljada A., Mohanty P., Ghanim H., Bandyopadhyay A., Chaudhuri A. 2003. Insulin suppresses plasma concentration of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9. *Diabetes Care.* 26 : 3310—3314.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8 : 315—317.
- Ghajar C. M., Kachgal S., Kniazeva E., Mori H., Costes S. V., George S. C., Putnam A. J. 2010. Mesenchymal cells stimulate capillary morphogenesis via distinct proteolytic mechanisms. *Exp. Cell Res.* 316 : 813—825.
- Guo L., Zhou Y., Wang S., Wu Y. 2014. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J. Cell Mol. Med.* 18 : 2009—2019.
- Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 141 : 52—67.
- Li Y., Guo G., Li L., Chen F., Bao J., Shi Y. J., Bu H. 2015. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell Tissue Res.* 360 : 297—307.
- Mannello F., Tonti G. A., Bagnara G. P., Papa S. 2006. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 24 : 475—481.
- Nagase H., Woessner J. F. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274 : 21 491—21 494.
- Oliver G. W., Stettler-Stevenson W. G., Kleiner D. E. 1998. Zymography, casein zymography and reverse zymography; activity proteases and their inhibitors. In: *Handbook of proteolytic enzymes.* San Diego: Acad. Press. 236 : 61—76.
- Ould-Yahoui A., Sbai O., Baranger K., Bernard A., Gueye Y., Charrat E., Clement B., Gignes D., Dive V., Girard S. D., Ferron F., Khrestchatsky M., Rivera S. 2013. Role of matrix metalloproteinases in migration and neurotrophic properties of nasal olfactory stem and ensheathing cells. *Cell Transplant.* 22 : 993—1010.
- Page-McCaw A., Ewald A. J., Werb Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 : 221—233.
- Philips N., Keller T., Holmes C. 2007. Reciprocal effects of ascorbate on cancer cell growth and the expression of matrix metalloproteinases and transforming growth factor- $\beta$ . *Cancer Lett.* 256 : 49—55.
- Polacek M., Bruun J. A., Elvenes J., Figenschau Y., Martinez I. 2011. The secretory profiles of cultured human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells: implications for autologous cell transplantation strategies. *Cell Transplant.* 20: 1381—1393.
- Pross C., Farooq M. M., Lane J. S., Angle N., Tomono C. K., Xavier A. E., Freischlag J. A., Collins A. E., Law R. E., Gelabert H. A. 2002. Rat and human aortic smooth muscle cells display differing migration and matrix metalloproteinase activities in response to dexamethasone. *J. Vasc. Surg.* 35 : 1253—1259.
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaille C. M. 2001. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 98 : 2615—2625.
- Rodriguez J. P., Montecinos L., Rios S., Reyes P., Martínez J. 2000. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.* 79 : 557—565.
- Sassoli C., Nosi D., Tani A., Chellini F., Mazzanti B., Quercio-li F., Zecchi-Orlandini S., Formigli L. 2014. Defining the role of mesenchymal stromal cells on the regulation of matrix metalloproteinases in skeletal muscle cells. *Exp. Cell Res.* 323 : 297—313.
- Schneider R. K., Puellen A., Kramann R., Raupach K., Bornemann J., Knuechel R., Perez-Bouza A., Neuss S. 2010. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodeling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials.* 31 : 467—480.
- Sharma S., Venkatesan V., Prakhya B.M., Bhonde R. 2015. Human mesenchymal stem cells as a novel platform for simultaneous evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals. *Mutagenesis.* 30 : 391—399.
- Sillat T., Saat R., Pöllänen R., Hukkanen M., Takagi M., Kontinen Y. T. 2012. Basement membrane collagen type IV expression by human mesenchymal stem cells during adipogenic differentiation. *J. Cell Mol. Med.* 16 : 1485—1495.
- Tratwal J., Mathiasen A. B., Juhl M., Brorsen S. K., Kastrop J., Ekblond A. 2015. Influence of vascular endothelial growth factor stimulation and serum deprivation on gene activation patterns of human adipose tissue-derived stromal cells. *Stem Cell Res. Ther.* 6 : 62—73.
- Wang K. X., Xu L. L., Rui Y. F., Huang S., Lin S. E., Xiong J. H., Li Y. H., Lee W. Y., Li G. 2015. The effects of secretion factors from umbilical cord derived mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 10 (3) : e0120593.
- Zhang H., Zhang B., Tao Y., Cheng M., Hu J., Xu M., Chen H. 2012. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from whole human umbilical cord applying a single enzyme approach. *Cell Biochem. Funct.* 30 : 643—649.

Поступила 12 V 2016

COMPARATIVE ANALYSIS OF MATRIX METALLOPROTEINASES ACTIVITY  
DURING DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELL LINES ISOLATED  
FROM DIFFERENT TISSUES FROM ONE DONOR

I. V. Voronkina,<sup>1</sup> L. V. Smagina, T. A. Krylova, A. S. Musorina, G. G. Poljanskaya

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: voronirina@list.ru

We have confirmed the ability of mesenchymal stem cell lines isolated from human early embryo bone marrow (FetMSC) and limb bud (M-FetMSC) and from cell spheroids derived therefrom to differentiation in osteogenic and adipogenic directions was confirmed. The presence of MMP-9, -2 and -1 during the process of adipogenic and osteogenic differentiation was shown for both cell lines. Comparative analysis of the dynamics of the MMP activities during the process of adipogenic and osteogenic differentiation showed the differences among cell lines and also differences among monolayer cultures (2D) and cell spheroids (3D). The correlation

between the level of adipogenic differentiation and levels of MMP-9 and -2 activities for both lines in 2D and 3D culture was shown. The low level of adipogenic differentiation in M-FetMSC line (2D) corresponds to reduced activity of MMP-2 and MMP-9 and increase of differentiation level (3D) resulted in significant increase of both MMP activities. Vice versa effect was shown for MMP-1 activity. The low level of adipogenic differentiation in M-FetMSC line (2D) corresponds to reduced activity of MMP-1 and increase of the level of adipogenic differentiation (3D) resulted in decrease of MMP-1 activity. The observed dynamics of MMP-1 and -9 activities was not associated with the level of osteogenic differentiation, which was unchanged in all variants. But MMP-2 activity and intensity of osteogenic differentiation were not changed in both cell lines at 2D and 3D culture. The results suggest that MMP can positively or negatively influence the differentiation of MSCs, that is related to the mechanism of MMPs action on the differentiation processes. Obtained differences in MMP activities during differentiation processes may exist both due to influence of different initial microenvironment and to different properties of ECM in 2D and 3D cultures.

**Key words:** mesenchymal stem cells, differentiation, matrix metalloproteinases.

---