

СНИЖЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ХОДЕ ДОЛГОСРОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НЕ СОПРЯЖЕНО С ИЗМЕНЕНИЕМ ИХ МИГРАЦИОННЫХ СВОЙСТВ

© Н. Ф. Михеева,¹ П. А. Бутылин,² А. Ю. Зарицкий,² Б. В. Попов^{1, *}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197341;

* электронный адрес: borisvp478@gmail.com

В контексте восстановительной терапии пролиферация и миграция мезенхимных стволовых клеток (МСК) представляют собой функциональные свойства, взаимосвязь которых остается неизученной. Цель настоящей работы заключалась в параллельной оценке пролиферативной и миграционной способности эндометриальных, жировых и костномозговых МСК человека (чМСК) в ходе долгосрочного культивирования. Миграционную способность чМСК оценивали в сравнении с таковой в эпителиальных клетках установленных линий человека НСТ116, МСF7 и А-549. чМСК, полученные из разных тканей, на ранних пассажах показывают сравнимую скорость деления, которая прогрессивно замедляется к 10-му пассажу, что соответствует снижению экспрессии маркера пролиферации Ki67 и циклина D1. Подвижность МСК при оценке миграции клеток через 8-микрометровые фильтры и методом «регенерации царапины» к 10-му пассажу не изменяется. Активной подвижности МСК различного тканевого происхождения соответствуют высокий уровень продукции N-кадгерина, виментина и отсутствие E-кадгерина, уровень которых в эпителиальных клетках линий НСТ116, МСF7 и А-549 инвертирован по сравнению с таковым в МСК. Результаты нашей работы показывают, что снижение пролиферативной активности МСК различной тканевой специфичности в ходе пассирования не сопряжено с изменениями их способности к миграции. Вероятно, механизмы регуляции деления и подвижности клетки генетически и функционально не связаны между собой и в ходе продолжительного культивирования изменяются автономно.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, пролиферация, миграция, маркеры пролиферации и миграции клеток.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки, эМСК — эндометриальные МСК, кмМСК — МСК костномозгового происхождения, жМСК — МСК из жировой ткани, эМСК-1 — культура № 1 эМСК, чМСК — МСК человека, ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, ФБС — фетальная бычья сыворотка.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) костного мозга были открыты более 30 лет назад (Friedenstein et al., 1976) и в настоящее время благодаря потенциалу к дифференцировке в различные типы мезодермальных клеток (Pittenger et al., 2009), пластичности (Krauze et al., 2001), иммуномодулирующим свойствам (Le Blanc et al., 2003) и способности размножаться *in vitro* нашли широкое применение в практической медицине в качестве ресурса для регенеративной терапии. МСК были обнаружены во многих органах зрелого организма (Meirelles, Nardi, 2009), включая ткани, которые могут служить доступными источниками клеток для восстановительного лечения: костном мозге, пуповинной крови (Мусина и др., 2007), менструальной крови (Мусина и др., 2008), амниотической жидкости (Давыдова и др., 2011), жировой ткани (Романов и др., 2006), плаценте (Ярыгин и др., 2009), пульпе зубов (Вахрушев и др., 2010), мочевом пузыре (Жидкова и др., 2013) и др. В первичных культурах МСК, полученные из различных тканей человека (костный мозг, жи-

ровая ткань и эндометрий), подобно фибробластам человека совершают ограниченное число делений и затем подвергаются клеточному старению, основным фенотипическим признаком которого является необратимое прекращение пролиферации (Ksiazek, 2009; Fridlyanskaya et al., 2015). Причиной клеточного старения МСК и других типов соматических клеток человека является укорочение и повреждение теломеров, что вызывает типовой ответ на повреждение ДНК (Raz et al., 2008). Эффекторный механизм такого ответа включает в себя повышение уровня ингибиторов циклинзависимых киназ p16^{Ink4a} и p21^{Cip1}, активацию ингибиторов деления клетки pRb и p53, инактивацию белков семейства E2F и остановку клеточного цикла (Turinetti et al., 2016).

В настоящее время МСК рассматривают как естественную систему репарации тканей (Phinney, Proctor, 2007) благодаря их способности к продолжительной пролиферации и активной миграции в место повреждения, где такие клетки выделяют ростовые факторы, изменяющие

тканевое микроокружение и способствующие заживлению раны (Pросор, 2007). В контексте восстановительной терапии пролиферация и миграция МСК представляют собой функциональные свойства клеток, взаимосвязь которых остается неизученной. Направленное движение МСК в очаг повреждения с целью репарации (хоминг) или в зону опухолевого роста для доставки лекарств, разрушающих опухоль, включает в себя в качестве моторной составляющей их способность к передвижению.

МСК обладают передне-задней полярностью, формирование которой регулируется белками семейства Rho, включающего в себя три ГТФазы — Cdc42, Rho и Rac. Cdc42 инициирует формирование полярности, Rac — формирование движущего переднего, а Rho — заднего края в подвижной клетке. Движение клетки представляет собой строго координированную последовательность событий, включающих в себя формирование выпячиваний мембраны на переднем крае, прикрепление к субстрату, перемещение цитозоля в переднюю часть клетки и втягивание задней части клетки (Etienne-Manneville, 2004). Эффекторный аппарат подвижности формируется активным цитоскелетом, который состоит из множества регуляторных и эффекторных белков, выполняющих разнообразные функции в ходе движения клетки. Ключевую роль в формировании динамических контактов с соседними клетками и внеклеточным матриксом играют кадгеринны, образующие один из типов межклеточных соединений. Мезенхимные клетки продуцируют нейтральный кадгерин (N-кадгерин), который характеризуется слабым сродством к гомологичным молекулам на соседних клетках, что облегчает миграцию (Theveneau, Mayor, 2012).

Обратимое изменение продукции N-кадгерина на E-кадгерин, «кадгеринное переключение», является ключевым событием мезенхимно-эпителиального (МЭП) и обратного эпителиально-мезенхимного (ЭМП) переходов, при которых клетки теряют или приобретают подвижность (Huang et al., 2012). ЭМП и МЭП участвуют в формировании эмбриональных зачатков и отдельных органов в ходе внутриутробного развития, а после рождения — в воспалении, заживлении ран, инвазии и метастазировании опухолей. Идея о физиологической основе ЭМП возникла из наблюдения, сделанного Элизабет Хей (Hay, 1995), которая описала изменение эпителиального фенотипа на мезенхимный в клетках примитивной полоски куриного эмбриона. N-кадгерин соединяет мембранные структуры клетки с ее цитоскелетом, важным элементом которого в подвижных клетках является белок промежуточных филаментов виментин. Синтез виментина, происходящий при приобретении подвижности, связан с реорганизацией цитоскелета, в частности с потерей продукции цитокератинов, изменением формы клетки, появлением ламеллоподий и филоподий, формированием актиновых стресс-фибрилл и активацией синтеза белков, способствующих деградации внеклеточного матрикса (Ridley, 2011; McNiven, 2013; Lamouille et al., 2014). Белки промежуточных филаментов регулируют челночное перемещение органелл и связанных с мембраной белков, при этом цитокератины (но не виментин) направляют E-кадгерин к клеточной мембране (Toivola et al., 2005). С другой стороны, виментин взаимодействует с моторными белками, стимулируя клеточную подвижность (Mendez et al., 2010).

Цель настоящей работы заключалась в параллельной оценке пролиферативной и миграционной способности чМСК различного тканевого происхождения в ходе дол-

госрочного культивирования. Первой задачей работы была оценка пролиферативной активности клеток в ходе культивирования от 3-го до 14-го пассажа. Вторая задача заключалась в характеристике миграционной способности чМСК с помощью оценки их способности мигрировать через 8-микрометровые фильтры и «регенерировать раневую» поверхность, нанесенную с использованием «техники царапины». В третью задачу входила оценка экспрессии в чМСК маркеров пролиферации и миграции с помощью различных методов, включая ОТ-ПЦР, иммуноблоттинг и иммунофлуоресценцию. Параллельная характеристика пролиферативной и миграционной способности МСК в ходе долгосрочного культивирования давала возможность представить возможный механизм их взаимосвязи.

Материал и методика

Клеточные линии и культивирование клеток. В работе использовали три клеточные линии эпителиального происхождения: колоректальную аденокарциному НСТ116 (любезно предоставлена Н. А. Барлевым, Институт цитологии РАН), аденокарциному легких А-549 и карциному молочной железы MCF7, которые были получены из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН). Четыре культуры эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (эМСК-1—эМСК-4) были получены ранее в нашей лаборатории из материала, предоставленного Д. А. Ниаури (Институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАН, Санкт-Петербург). Культуры МСК из костного мозга и жировой ткани (кММСК и жМСК соответственно), полученные от доноров мужского пола в возрасте 45 и 54 лет, были приготовлены и охарактеризованы в Национальном медицинском исследовательском центре им. В. А. Алмазова и предоставлены нам на 3-м пассаже. Клетки культивировали на чашках Петри диаметром 100 мм до достижения плотности 90 % в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM) и содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 1 % гентамицина, в CO₂-инкубаторе при 5 % CO₂ и 100%-ной влажности.

Определение скорости деления клеток. Скорость деления клеток оценивали путем определения времени удвоения клеточной культуры. Культуры клеток, растущие экспоненциально в чашках 100 мм, при достижении 80%-ной плотности насыщения трипсинизировали, подсчитывали число клеток с помощью камеры Горяева и высевали по $2 \cdot 10^4$ клеток в лунку 96-луночного планшета в 100 мкл ростовой среды. При каждом определении клетки подсчитывали в трех лунках каждой культуры через 96 ч, повторяя опыт не менее трех раз. Время удвоения клеточной популяции рассчитывали по формуле $D = T \log_{x_1/x_0} 2$, где $T = 96$ ч, x_1 и x_0 — число клеток в конце и начале эксперимента соответственно.

Оценка миграционной подвижности клеток с помощью фильтров с порами 8 мкм. В лунки 24-луночной культуральной пластины вносили по 750 мкл ростовой среды и затем помещали вставки с фильтрами, имеющими 8-микрометровые поры (Thermo Fisher Scientific, США). В верхний отдел лунки помещали $3 \cdot 10^5$ экспоненциально растущих клеток в 300 мкл среды, содержащей 0.15 % ФБС. Клетки инкубировали 24 ч в CO₂-инкубаторе, затем фильтры промывали PBS, фиксировали 10 мин 4%-ным параформальдегидом, промы-

Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР

Ген	Прямой праймер, 5'—3'	Обратный праймер, 5'—3'
<i>GAPDH</i>	CCATCTTCCAGGAGCGAGA	GGCAGTGATGGCATGGACTGT
<i>Циклин D1</i>	GAGGAGCTGCTGCAAATGGA	TGTTTGTCTCCTCCGCCTC
<i>Ki-67</i>	GAGGTGTGCAGAAAATCCAAA	GGCAAACAACGACGACACA
<i>Виментин</i>	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	GCTTCCTGTAGGTGGCAATC
<i>N-кадгерин</i>	ACAGTGGCCACCTACAAAGG	CCGAGATGGGGTTGATAATG
<i>E-кадгерин</i>	TGCCAGAAAATGAAAAAGG	GTGTATGTGGCAATGCGTTC

вали PBS, отделяли мембрану фильтра, переносили ее на предметное стекло нижней поверхностью вверх и заключали в среду Anti-Fade (BioRad, США), содержащую DAPI для окраски ядерной ДНК. Число клеток на мембране подсчитывали по флуоресценции DAPI на микроскопе Pascal (Германия), суммируя число клеток в 15 полях зрения. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Оценка подвижности клеток методом «регенерации царапины». В лунки 6-луночной пластины вносили по $8 \cdot 10^5$ экспоненциально растущих клеток. На следующие сутки после прикрепления клеток к пластику наносили царапину путем удаления слоя клеток с помощью наконечника на 200 мкл для пипеточного дозатора, проводя им прямую линию по диаметру чашки. Сразу после нанесения царапины получали ее изображение в проходящем свете при фазовом контрасте на микроскопе EVOS® FL Auto (Thermo Fisher Scientific, США). Съемку в том же режиме повторяли через 24 и 48 ч. Площадь царапины определяли с помощью доступной онлайн программы Image J.

Экстракцию общеклеточной РНК осуществляли с помощью набора Thermo Scientific MagJET RNA Kit (США). Процесс выделения РНК включал в себя следующие этапы — лизис пробы, связывание РНК на магнитных шариках, удаление ДНК, промывку и элюирование РНК. На 1 пробу в пробирку с клеточным осадком добавляли 450 мкл лизирующего буфера, 10 мкл 14.3 М бета-меркаптоэтанола и 40 мкл магнитных бус (MagJET Magnetic Beads, Thermo Scientific, США), ресуспендировали на вортексе и добавляли 400 мкл перегнанного 96%-ного этанола. Суспензию перемешивали на вортексе 5 мин и помещали в магнитный штатив для формирования осадка, содержащего магнитные бусы. Супернатант удаляли, добавляли 200 мкл 1-кратного буфера для ДНКазы I, перемешивали, затем инкубировали пробирки с образцами в термостате при 37 °С 15 мин, добавляли 200 мкл перегнанного этанола, перемешивали на вортексе, инвертировали в течение 5 мин, помещали образцы в магнитный штатив для формирования осадка, удаляли супернатант, промывали образцы 700 мкл отмывочного буфера, перемешивая 1 мин инвертированием, помещали образцы в магнитный штатив до формирования осадка, удаляли супернатант. Затем образцы дважды промывали 700 мкл отмывочного буфера, добавляли по 30 мкл воды и инкубировали 5 мин в термостате при 65 °С. Пробирки помещали в магнитный штатив до формирования осадка и переносили растворенную РНК в чистые пробирки. Концентрацию РНК определяли при помощи спектрофотометра при длине волны 260 нм, а ее целостность — при помощи электрофореза в денатурирующем агарозном геле с формальдегидом по наличию полос РНК 28S и 18S. РНК хранили при –20 °С.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для синтеза кДНК 2 мкг РНК смешивали с 1 мкл праймера олиго-дТ18, объемом смеси доводили до 12.5 мкл и инкубировали 5 мин при 65 °С, затем охлаждали и добавляли 4 мкл 5-кратного буфера для обратной транскриптазы (Thermo Scientific, США), 0.5 мкл обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Scientific, США), 2 мкл 10 мМ смеси дНТФ и 0.25 мкл ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo Scientific, США), инкубировали 1 ч при 42 °С. Реакцию останавливали нагреванием до 70 °С в течение 10 мин.

Полученную кДНК хранили при –20 °С. Для амплификации с помощью ПЦР на 1 реакцию использовали 0.5 мкл 10 мМ смеси дНТФ, 2.5 мкл 10-кратного буфера для Taq-полимеразы, по 0.1 мкл прямого и обратного праймеров (табл. 1), 0.125 мкл Taq-полимеразы и воду до 25 мкл общего объема реакционной смеси. кДНК брали в количестве 0.5 мкл. Ген *GAPDH* амплифицировали в ходе 25 циклов, а все опытные гены — в ходе 35 циклов. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 2%-ном агарозном геле.

Электрофорез белков в денатурирующих условиях и иммуноблотинг. Электрофорез проводили в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). Объем пробы брали из расчета 50 мкг общеклеточного белка на дорожку. Пробу переносили в пробирку, содержащие равный объем буфера для нанесения проб на гель (4 % SDS, 20 % глицерина, 1 % β-меркаптоэтанола, 120 мМ Трис-НСl (рН 6.8) и 0.002 % бромфенолового синего), инкубировали в термостате 5 мин при 95 °С и наносили на гель. Электрофоретическое разделение белков проводили при постоянном токе 12 мА. Белки, разделенные электрофоретически, переносили с геля на мембрану PVDF (Millipore, США) с помощью полусухого электропереноса в камере Hoefer Semiphor TE 77 (Швеция) при постоянной силе тока 70 мА. Буфер для переноса содержал 47.9 мМ Трис-НСl, 38.6 мМ глицина и 10 % метанола. Для блокировки сайтов неспецифического связывания мембрану инкубировали 1 ч в блокирующем растворе (5 % обезжиренного молока в TBST (150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl (рН 8.0) и 0.05 % Tween 20). Антитела для гибридизации разводили в блокирующем растворе. В качестве вторых антител использовали видоспецифические антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, которую визуализировали на мембране с помощью реактива Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, США). Для этого компоненты набора смешивали в соотношении 1 : 1 из расчета 0.1 мл раствора на 1 см² мембраны, наносили на мембрану и инкубировали 5 мин. Изображения препаратов, активированных с помощью хемиллюминесценции, получали на приборе ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, США).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Покровные стекла с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в пластиковые чашки 35 мм, однократно отмывали PBS 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 15 мин, затем 70%-ным этиловым спиртом в течение ночи при 4 °С; обрабатывали 0.2%-ным детергентом Тритоном X-100 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин, сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3 % бычьего сывороточного альбумина и 0.1 % Твина 20; затем на клетки наносили специфические антитела (разведение в 50—200 раз) в блокирующем растворе на 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза по 5 мин PBS, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре вторыми антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой, отмывали 3 раза по 5 мин PBS и заключали в среду Anti-Fade (BioRad, США), уменьшающую неспецифическую флуоресценцию и содержащую краситель DAPI для окраски ДНК. Иммунофлуоресцентные изображения получали на электронном сканирующем конфокальном микроскопе OLYMPUS FV3000, используя лазеры с длинами волн 405 и 561 нм.

Антитела. В работе использовали мышинные моноклональные антитела против N-кадгерина, E-кадгерина, виментина (Life Technologies, США), β -актина (Sigma, США), видоспецифические антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, против Ig кролика (Cell Signaling, США), против Ig мыши (BioRad, США), конъюгированные с Cy3® козлиные антитела против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов мыши (Invitrogen, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием средней арифметической величины и ее ошибки, определяемых с помощью программы Microsoft Office Excel, 2010. Для оценки достоверности различий использовали критерий Стьюдента. Различия между двумя группами считали достоверными при $P < 0.05$. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Результаты

Характеристика пролиферативной активности МСК в ходе культивирования. МСК разного происхождения (эмСК, жМСК и кмМСК) культивировали от 3—5-го до 14-го пассажа. Учитывая, что клетки культур чМСК перестают делиться после 15—25-го пассажа (результаты не показаны), мы условно использовали 3—9-й пассажи как ранние, а 10—14-й — как поздние. В ходе культивирования на ранних пассажах время удвоения эмСК (эмСК-3 были доступны с 7-го пассажа и не включены в эту оценку) увеличивается в 2.3—2.6, жМСК — в 1.9, а кмМСК — в 1.6 раза, соответственно уменьшается скорость их деления (табл. 2). Значительно более резкое замедление скорости деления происходит на поздних пассажах. Так, в эмСК она уменьшается в 4.3—5.1, в жМСК — в 4.9, а в кмМСК — в 3.6 раза по сравнению с таковой на самом раннем из использованных пассажей для одноименной линии (табл. 2). Сравнение пролиферативной активности МСК различной тканевой специфичности на 5—7-м и 10-м пассажах показывает, что до 10-го пассажа жМСК и кмМСК делятся еще значительно быстрее, чем эмСК. Скорость деления эмСК к 10-му пассажиру снижается в значительно большей степени, чем в МСК других тканей (рис. 1, а).

Характеристика миграционной способности МСК в ходе культивирования через фильтры 8 мкм. Сравнив на ранних пассажах способность чМСК, происходящих из разных тканей, мигрировать через 8-микрометровые поры, мы не выявили значительных различий (рис. 1, б), поэтому для дальнейших экспериментов были использованы эмСК-1 на 5, 10 и 24-м пассажах и эмСК-3 на 7-м и 14-м пассажах. Для сравнения способности к миграции подвижных мезенхимных и «неподвижных» эпителиальных клеток в этих экспериментах использовали клетки трех эпителиальных линий — НСТ116, А-549 и МСF7. Полученные данные показали, что чМСК мигрируют значительно активнее клеток эпителиальных линий (рис. 1, б). Мы не выявили значительных различий между уровнем миграционной активности эмСК-1 и эмСК-3 на ранних и поздних пассажах. Только на 24-м пассаже эмСК-1 показывали 2-кратное снижение миграционной активности по сравнению с таковой у клеток той же линии на 10-м пассаже, но даже в этом случае подвижность эпителиальных клеток была в 2 раза менее активной, чем подвижность эмСК-1 на 24-м пассаже (рис. 1, б).

Характеристика миграционной способности чМСК в ходе культивирования с помощью метода «регенерации царапины». эмСК ранних пассажей уже через 1 сут после начала эксперимента наполовину «регенерируют» площадь царапины, т. е. покрывают половину поверхности, с которой в начале опыта были удалены все клетки (рис. 2, в, з). Через 2 сут площадь царапины практически полностью покрывается и в чМСК поздних пассажей. Клетки эпителиальных линий А-549 и МСF7 через 2 сут частично закрывают площадь царапины, тогда как клетки линии НСТ116 в течение 48 ч культивирования не «регенерируют» царапину (рис. 2, в, з).

Экспрессия маркеров пролиферации чМСК в процессе длительного культивирования с помощью ОТ-ПЦР. Эффекторный маркер пролиферации Ki67, уровень продукции которого прямо соответствует пролиферативной активности клеток, выявлялся на высоком уровне на 5-м пассаже в чМСК всех использованных нами культур, и его экспрессия заметно снижалась на 10-м пассаже (рис. 2, а). Изменение экспрессии циклина D1 в ходе пассирования МСК разных линий было подобным таковому Ki67 (рис. 2, а).

Характеристика экспрессии эффекторных маркеров подвижности в МСК с помощью ОТ-ПЦР. В качестве эффекторных маркеров подвижности мезенхимных клеток мы использовали виментин и N-кадгерин, а эпителиальных — E-кадгерин. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень экспрессии N-кадгерина и виментина значительно выше в мезенхимных, чем в эпителиальных клетках, и в ходе пассирования от 5-го до 10-го пассажа не снижается (рис. 2, б).

Оценка экспрессии эффекторных маркеров подвижности в чМСК с помощью иммунооблотинга и иммунофлуоресценции. Для этих экспериментов были выбраны те же клеточные культуры, что и для оценки клеточной подвижности, — эмСК-1, эмСК-3 на 5, 7 и 10-м пассажах и клетки трех эпителиальных линий (МСF7, НСТ116 и А-549). Результаты эксперимента выявили высокий уровень экспрессии N-кадгерина в мезенхимных, а E-кадгерина — в эпителиальных линиях. В ходе пассирования уровень экспрессии

Т а б л и ц а 2

**Время удвоения МСК человека различного тканевого происхождения
в ходе культивирования от 3-го до 12-го пассажа**

Культура чМСК	Ранний пассаж	Время удвоения, сут	Поздний пассаж	Время удвоения, сут
эмСК-1	3	1.77 ± 0.02	10	6.88 ± 0.33
	5	2.08 ± 0.02	11	9.02 ± 0.78
	6	2.27 ± 0.02		
	7	2.65 ± 0.07		
	8	3.22 ± 0.05		
	9	5.36 ± 0.28		
эмСК-2	5	2.34 ± 0.04	10	7.98 ± 0.26
	7	2.82 ± 0.08	12	10.12 ± 0.44
	8	3.30 ± 0.07		
	9	5.92 ± 0.23		
эмСК-3	7	2.25 ± 0.01	10	5.43 ± 0.10
	8	2.81 ± 0.05	11	7.72 ± 0.26
	9	3.30 ± 0.03	12	9.68 ± 0.44
эмСК-4	4	2.36 ± 0.02	10	7.05 ± 0.21
	5	2.54 ± 0.25	11	8.91 ± 0.33
	7	2.88 ± 0.02	12	11.81 ± 0.62
	8	3.28 ± 0.07		
	9	5.55 ± 0.19		
жМСК	3	1.74 ± 0.01	10	4.66 ± 0.19
	4	1.93 ± 0.01	11	5.92 ± 0.23
	5	2.20 ± 0.02	12	8.57 ± 0.33
	6	2.39 ± 0.06		
	7	2.57 ± 0.05		
	8	2.76 ± 0.04		
кмМСК	4	1.69 ± 0.02	10	3.49 ± 0.09
	5	1.80 ± 0.02	11	4.16 ± 0.05
	6	1.89 ± 0.01	12	6.18 ± 0.14
	7	2.04 ± 0.02		
	8	2.25 ± 0.03		
	9	2.71 ± 0.04		

N-кадгерина не изменялся в эмСК-1 и уменьшался в эмСК-3 на поздних пассажах (рис. 2, в). Иммунофлуоресцентная оценка выявила высокий уровень продукции цитокератина 8 в эпителиальных линиях, а виментина — в мезенхимных (рис. 2, г).

Обсуждение

При долгосрочном культивировании чМСК подвергаются репликативному старению вследствие укорочения и повреждения теломеров и активации ответа на повреждение ДНК в ходе каждого клеточного цикла, так как в стромальных клетках человека отсутствует теломеразный комплекс, воспроизводящий концы хромосом (Itahana et al., 2003). Механизм ответа на повреждение ДНК в МСК включает в себя активацию киназ АТМ и АТР, распознающих поврежденную ДНК, индукцию сигнальных путей p16-pRb, p53-p21 и необратимую остановку клеточного цикла (Dmitrieva et al., 2012; Borodkina et al., 2014; Turinetti et al., 2016). Хотя общие механизмы старения чМСК в культуре включают в себя вышеназванные

сигнальные пути, существуют важные различия вклада каждого из них в механизм старения, вызванного долгосрочным культивированием или преждевременным старением, индуцированным различными стрессорными факторами. В частности, при стрессиндуцированной форме клеточного старения важную роль играет повышение уровня p16^{Ink4a}, тогда как укорочение теломеров при долгосрочном культивировании вызывает активацию p53 и p21, но не p16^{Ink4a} (Herbig et al., 2004).

Потеря терапевтического потенциала МСК, вызванного клеточным старением, зависит от нескольких компонентов, в частности от снижения их пролиферативной и миграционной активности. Миграционная скорость МСК крыс значительно замедляется после долгосрочного культивирования (Geissler et al., 2012), при котором происходит потеря активности генов, связанных с фокальной адгезией и формированием цитоскелета (Le Clairche, Carlier, 2008). Хотя опубликованные данные свидетельствуют о том, что потеря терапевтического потенциала МСК, вызванного клеточным старением, является следствием снижения их пролиферативных и миграционных свойств, в известной нам литературе отсутствуют работы, в кото-

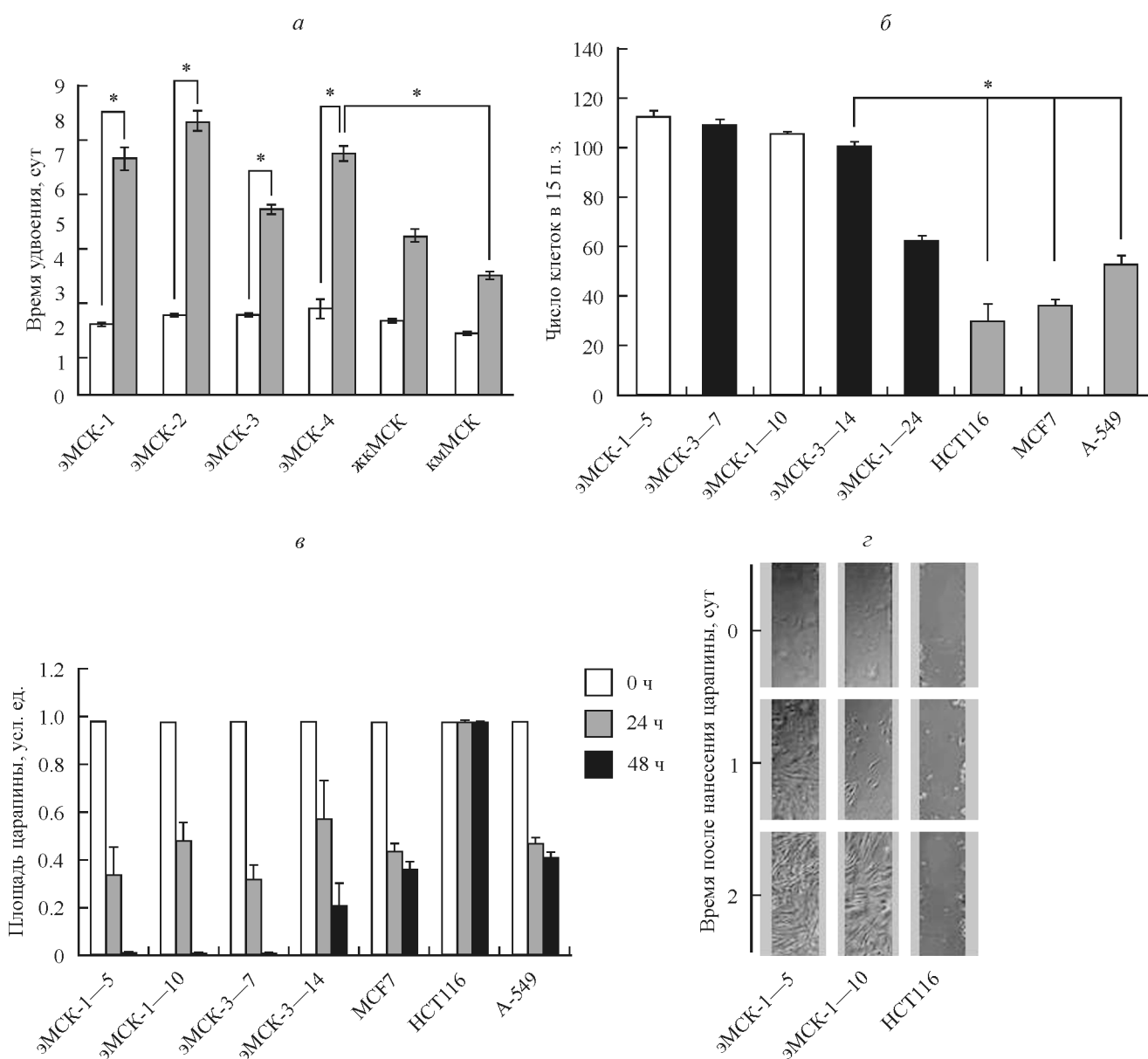


Рис. 1. Пролиферативная (а) и миграционная (б—г) способность чМСК различной тканевой специфичности в ходе продолжительного пассирования.

а — гистограммы времени удвоения чМСК на ранних (белые столбики) и поздних (черные столбики) пассажах; звездочка — $P < 0.05$ при сравнении эмСК-1—4 на ранних и поздних пассажах, эмСК-4 с кмМСК на поздних пассажах; б — гистограммы миграции эмСК-1 на 5, 10 и 24-м пассажах, эмСК-3 на 7-м и 14-м пассажах через 8-микрометровые фильтры по сравнению с клетками эпителиальных линий; различия достоверны (звездочка — $P < 0.05$) при сравнении эмСК-3 на 14-м пассаже с клетками эпителиальных линий; разница между эмСК-1 на 5-м и 10-м пассажах, а также эмСК-3 на 7-м пассаже с клетками эпителиальных линий тоже достоверна ($P < 0.05$), но не показана на рисунке, п. з. — поле зрения. в — гистограммы «регенерации царапины» эмСК-1 (пассажи 5 и 10) и эмСК-3 (пассажи 7 и 14) по сравнению с клетками эпителиальных линий через 24 и 48 ч после ее нанесения; площадь царапины через 0, 24 и 48 ч после ее нанесения оценивали с помощью программы Image J. г — имиджи «регенерации царапины» эмСК-1 на 5-м и 10-м пассажах. Снимки сделаны на микроскопе EVOS® FL Auto, об. 4×. Данные (а—в) представлены средней арифметической и ее ошибкой.

рых сочетанно изучались указанные свойства МСК. С другой стороны, механизмы регуляции и эффекторные аппараты деления и миграции клеток различные и могут быть функционально разобщены. Целью нашей работы была сравнительная оценка пролиферативной и миграционной способности чМСК различного тканевого происхождения в ходе долгосрочного культивирования.

чМСК различного тканевого происхождения на ранних пассажах показывают сравнимую скорость деления, которая прогрессивно замедляется к 10-му пассажу. На поздних пассажах снижение скорости деления чМСК вы-

ражено в большей степени, чем на ранних, причем кмМСК сохраняют пролиферативную активность в большей степени, чем эмСК и жМСК (табл. 2). Прогрессивное замедление при пассировании скорости деления чМСК (табл. 2; рис. 1, а) соответствует снижению в таких клетках экспрессии маркера Ki67 и циклина D1 на поздних пассажах по отношению к ранним (рис. 2, а) (Baldin et al., 1993; Scholzen, Gerdes, 2000) и связано с укорочением теломеров. Установлено, что в ходе каждого удвоения МСК теломеры в них укорачиваются на 50—100 пар оснований (Parsch et al., 2004; Raz et al., 2008). В чМСК не

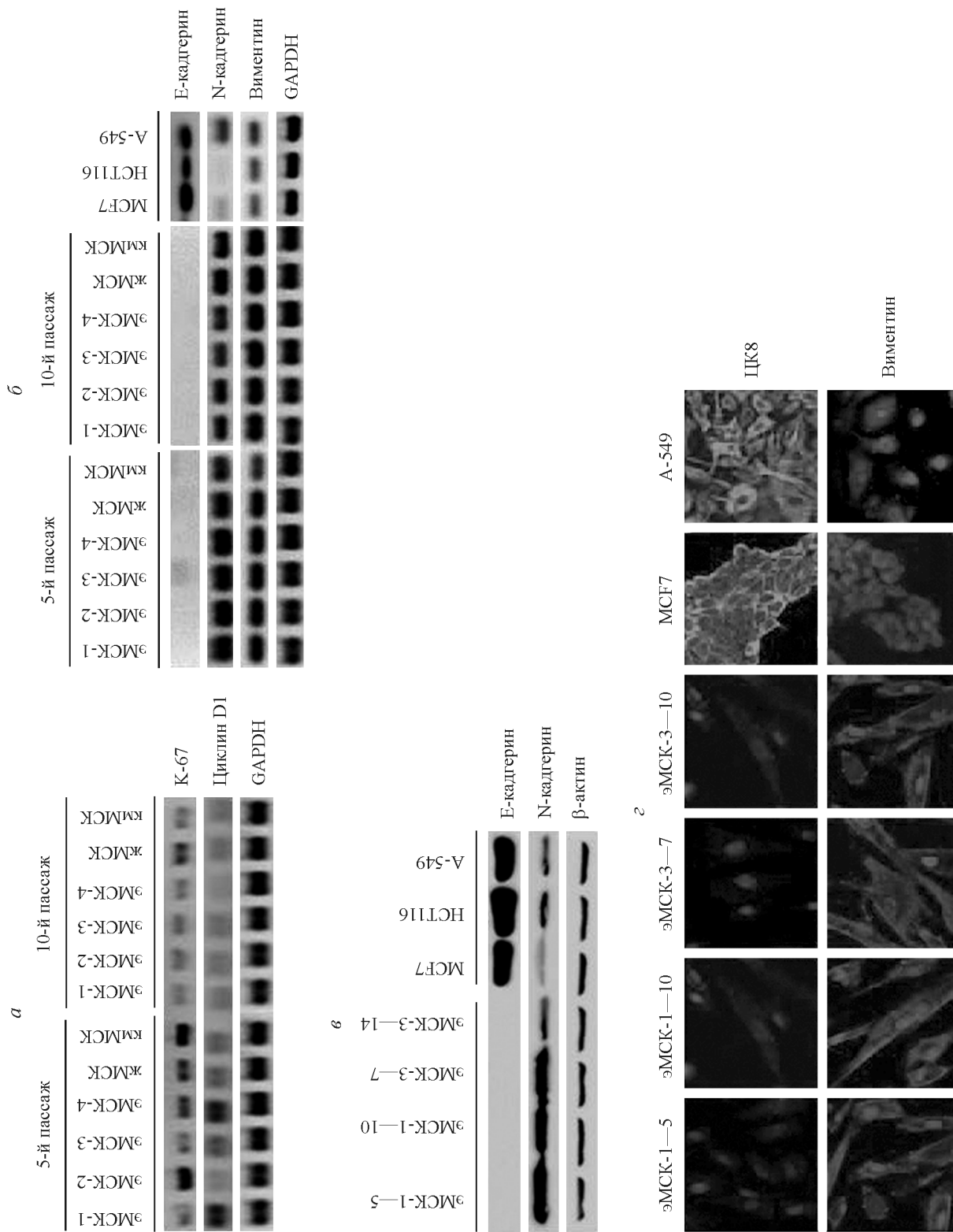


Рис. 2. Продукция маркеров пролиферации и миграции чМСК различной тканевой специфичности в ходе продолжительного культивирования.

а, б — оценка экспрессии соответственно пролиферативных и миграционных маркеров с помощью ОТ-ПЦР; представлены 10%-ного денатурирующего геля электрофореза в 2%-ном агарозном геле. *в* — продукция E- и N-кадгерина эМСК и клетками эпителиальных линий; иммуноблот, на дорожку 10%-ного денатурирующего геля наносили экстракты клеток, содержащие 50 мкг общеклеточного белка. *г* — иммунофлуоресцентная оценка продукции цитокератина 8 (ЦК8) и виментина эМСК-1 на 5-м и 10-м пассажах, эМСК-3 на 7-м и 10-м пассажах, а также клетками эпителиальных линий. Снимки сделаны на конфокальном сканирующем микроскопе OLYMPUS FV3000, лазеры 405 и 561 нм, об. 40X.

определяется или выявляется на низком уровне эндогенная теломеразная активность (Bernardo et al., 2007). Основным механизмом, вызывающий в МСК остановку клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК, включает в себя индукцию p53 и его мишени p21^{Cip1} (Herbig et al., 2004), что в клетках некоторых типов сочетается с повышением уровня p16^{Ink4a} (Jacobs et al., 2004). Более выраженное замедление в наших экспериментах скорости деления эМСК и жМСК по сравнению с кмМСК может быть связано с различиями в этих клетках индукции p16^{Ink4a}. Интересно, что МСК мышцы в отличие от чМСК в культуре не подвержены клеточному старению вследствие спонтанной трансформации (Гринчук и др., 2007; Попов и др., 2009), что может быть связано с высоким уровнем мутаций опухолевого супрессора P53 в мышечных клетках (Rubio et al., 2010).

Результаты нашей работы показывают, что в ходе пассирования МСК от 3-го до 14-го пассажа их миграционная подвижность (миграция через 8-микрометровые фильтры и «регенерация царапины») практически не изменяется. Способность клеток мигрировать заметно уменьшается в эМСК-1 только на 24-м пассаже, но и в этом случае она еще значительно превышает подвижность клеток всех исследованных нами эпителиальных линий (рис. 1, б). Активной подвижности МСК соответствуют высокий уровень экспрессии N-кадгерина, виментина и отсутствие E-кадгерина, уровень которых в эпителиальных клетках инвертирован по сравнению с таковым в мезенхимных (рис. 2, б, в). Эти данные соответствуют представлениям о том, что при смене эпителиального фенотипа на мезенхимный происходит «кадгериновое переключение», включающее в себя снижение синтеза E-кадгерина, цитокератинов и активацию продукции N-кадгерина и виментина (Huang et al., 2012). В целом результаты нашей работы показывают, что снижение пролиферативной активности чМСК различной тканевой специфичности в ходе пассирования не сопряжено с изменениями их способности к миграции. Вероятно, механизмы регуляции деления и подвижности клетки генетически и функционально не связаны между собой и могут изменяться автономно в ходе продолжительного культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00251), которая обеспечила проведение электрофореза, иммуноблоттинга, иммунофлуоресценции, а также Российского научного фонда (проект 14-50-00068), на средства которого выполнен анализ экспрессии функционально различных маркеров с помощью ОТ-ПЦР.

Список литературы

Вахрушев И. В., Суздальцева Ю. Г., Бурунова В. В., Каралкин В. В., Лупатов А. Ю., Ярыгин К. Н. 2010. Мезенхимальные клетки пульпы молочного зуба: цитофенотип и первичная оценка возможности применения в тканевой инженерии костной ткани. Клеточные технологии в биологии и медицине. 1 : 55—60. (Vakhrushev I. V., Suzdal'tseva Y. G., Burunova V. V., Karalkin P. A., Lupatov A. Y., Yarygin K. N. 2010. Cell Technol. Biol. Med. 1 : 55—60.)

Гринчук Т. М., Иванцов К. М., Алексеенко Л. Л., Кожухарова И. В., Зайчик А. М., Михайлов В. М., Петров Н. С., Попов Б. В. 2007. Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток мышцы, экспрессирующих GFP. Цитология. 50 (12) :

1029—1034. (Grinchuk T. M., Ivantsov K. M., Alekseenko L. L., Kozhukharova I. V., Zaichik A. M., Petrov N. S., Mikhailov V. M., Popov B. V. 2007. Characterization of cultured murine mesenchymal stem cell line expressing GFP. Tsitologiya. 50 (12) : 1030—1035.)

Давыдова Д. А., Воротеляк Е. А., Брагина Е. Е., Терских В. В., Васильев А. В. 2011. Культивирование стволовых клеток амниотической жидкости человека в трехмерном коллагеновом матриксе. Цитология. 53 (4) : 325—331. (Davydova D. A., Vorotelyak E. A., Bragina E. E., Terskikh V. V., Vasiliev A. V. 2011. Culture of human amniotic fluid stem cells in ED collagen matrix. Tsitologiya. 53 (4) : 325—331.)

Жидкова О. В., Петров Н. С., Попов Б. В. 2013. Получение и характеристика маркерных и ростовых свойств мезенхимных стволовых клеток мочевого пузыря. Журн. эволюц. физиол. и биохим. 49 (1) : 67—77. (Zhidkova O. V., Petrov N. S., Popov B. V. 2013. Production and characteristics of the growth and marker properties of mesenchymal stem cells of urinary bladder. J. Evol. Biochem. Fyziol. 49 (1) : 67—77.)

Мусина Р. А., Бекчанова Е. С., Белявский А. В., Гриненко Т. С., Сухих Г. Т. 2007. Мезенхимальные стволовые клетки пуповинной крови. Клеточные технологии в биологии и медицине. 1 : 11—16. (Musina R. A., Bekchanova E. S., Belyavskii A. V., Grinenko T. S., Sukhikh G. T. 2007. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Cell Technol. Biol. Med. 1 : 11—16.)

Мусина Р. А., Белявский А. В., Тарусова О. В., Соловьева Е. В., Сухих Г. Т. 2008. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2 : 110—114. (Musina R. A., Belyavskii A. V., Tarusova O. V., Solovyova E. V., Sukhikh G. T. 2008. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. Cell Technol. Biol. Med. 2 : 110—114.)

Попов Б. В., Петров Н. С., Михайлов В. М., Томилин А. Н., Алексеенко Л. Л., Гринчук Т. М., Зайчик А. М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре in vitro. Цитология. 51 (2) : 91—102. (Popov B. V., Petrov N. S., Mikhailov V. M., Tomilin A. N., Alekseenko L. L., Grinchuk T. M., Zaichik A. M. 2009. Spontaneous transformation and immortalization of mesenchymal stem cells in vitro. Tsitologiya. 51 (2) : 91—102.)

Романов Ю. А., Даревская А. Н., Кабаева Н. В., Антонова О. А. 2006. Выбор оптимальных условий культивирования мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга и жировой ткани человека. Клеточные технологии в биологии и медицине. 4 : 206—211. (Romanov Y. A., Darevskaya A. N., Kabayeva N. V., Antonova O. A. 2006. Optimum conditions for culturing of human bone marrow and adipose tissue mesenchymal precursor cells. Cell Technol. Biol. Med. 4 : 206—211.)

Ярыгин К. Н., Холоденко И. В., Кониева А. А., Бурунова В. В., Таирова Р. Т., Губский Л. В., Чеглаков И. Б., Пирогов Ю. А., Ярыгин В. Н., Скворцова В. И. 2009. Механизмы положительного влияния трансплантации МСК плаценты человека на восстановление крыс после экспериментального ишемического инсульта. Бюл. эксп. биол. мед. 148 : 699—702. (Yarygin K. N., Kholodenko I. V., Konieva A. A., Burunova V. V., Tairova R. T., Gubsky L. V., Cheglakov I. B., Pirogov Y. A., Yarygin V. N., Skvortsova V. I. 2009. Mechanisms of positive effects of transplantation of human placental mesenchymal stem cells on recovery of rats after experimental ischemic stroke. Bull. Exp. Biol. Med. 148 : 862—868.)

Baldin V., Lukas J., Marcote M. J., Pagano M., Draetta G. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. Genes Develop. 7 : 812—821.

Bernardo M. E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A. M., Avanzini M. A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M. G., Zuffardi O., Locatelli F. 2007. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. Cancer Res. 67 : 9142—9149.

Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E. 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mito-

chondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging* (Albany NY). 6 : 481—495.

Dmitrieva R. I., Minullina I. R., Bilibina A. A., Tarasova O. V., Anisimov S. V., Zaritskiy A. Y. 2012. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle*. 11 : 377—383.

Etienne-Manneville S. 2004. Cdc42 — the centre of polarity. *J. Cell Sci.* 117 : 1291—1300.

Fridlyanskaya I., Alekseenko L., Nikolsky N. 2015. Senescence as a general cellular response to stress: a mini-review. *Exp. Gerontol.* 72 : 124—128.

Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4 : 267—274.

Geissler S., Textor M., Kuhnisch J., Konnig D., Klein O., Ode A., Pfitzner T., Adjaye J., Kasper G., Duda G. N. 2012. Functional comparison of chronological and *in vitro* aging: differential role of the cytoskeleton and mitochondria in mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE*. 7 : e52700.

Hay E. D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)*. 154 : 8—20.

Herbig U., Jobling W. A., Chen B. P., Chen D. J., Sedivy J. M. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell*. 14 : 501—513.

Huang R. Y., Guilford P., Thiery J. P. 2012. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 125 : 4417—4422.

Itahana K., Zou Y., Itahana Y., Martinez J. L., Beausejour C., Jacobs J. J., Van Lohuizen M., Band V., Campisi J., Dimri G. P. 2003. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell Biol.* 23 : 389—401.

Jacobs J. J., de Lange T. 2004. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol.* 14 : 2302—2308.

Krause D. S., Theise N. D., Collector M. I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S., Sharkis S.J. 2001. Multi-organ, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 105 : 369—377.

Ksiazek K. 2009. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Res.* 12 : 105—116.

Lamouille S., Xu J., Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 : 178—196.

Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringden O. 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 31 : 890—896.

Le Clainche C., Carlier M. F. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* 88 : 489—513.

McNiven M. A. 2013. Breaking away: matrix remodeling from the leading edge. *Trends Cell Biol.* 23 : 16—21.

Meirelles L. S., Nardi N. B. 2009. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front. Biosci.* 14 : 4281—4298.

Mendez M. G., Kojima S., Goldman R. D. 2010. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* 24 : 1838—1851.

Parsch D., Fellenberg J., Brümmendorf T. H., Eschlbeck A. M., Richter W. 2004. Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J. Mol. Med. (Berlin)*. 82 : 49—55.

Phinney D. G., Prockop D. J. 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair — current views. *Stem Cells*. 25 : 2896—2902.

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.

Prockop D. J. 2007. «Stemness» does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin. Pharmacol. Ther.* 82 : 241—243.

Raz V., Vermolen B. J., Garini Y., Onderwater J. J., Mommaas-Kienhuis M. A., Koster A. J., Young I. T., Tanke H., Dirks R. W. 2008. The nuclear lamina promotes telomere aggregation and centromere peripheral localization during senescence of human mesenchymal stem cells. *J. Cell Sci.* 121 : 4018—4028.

Ridley A. J. 2011. Life at the leading edge. *Cell*. 145 : 1012—1022.

Rubio R., García-Castro J., Gutiérrez-Aranda I., Paramio J., Santos M., Catalina P., Leone P. E., Menendez P., Rodríguez R. 2010. Deficiency in p53 but not retinoblastoma induces the transformation of mesenchymal stem cells *in vitro* and initiates leiomyosarcoma *in vivo*. *Cancer Res.* 70 : 4185—4194.

Scholzen T., Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182 : 311—322.

Theveneau E., Mayor R. 2012. Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24 : 677—684.

Toivola D. M., Tao G. Z., Habtezion A., Liao J., Omary M. B. 2005. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* 15 : 608—617.

Turinetti V., Vitale E., Giachino C. 2016. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 17. Pii: E1164. Di: 10.3390/ijms17071164.

Поступила 22 VII 2017

THE DECREASE IN PROLIFERATIVE ACTIVITY OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN LONG TERM CULTURE DOES NOT INDUCE ALTERATION OF THEIR MIGRATION ABILITY

N. F. Miheeva,¹ P. A. Butilin,² A. Y. Zaritskiy,² B. V. Popov^{1,*}

¹ Institute of Cytology RAS, St.Petersburg, 194064, and

² V. A. Almazov National Medical Research Center, Minzdrav RF, St. Petersburg, 197341;

* e-mail: borisvp478@gmail.com

In the context of regenerative therapy, the proliferation and migration of mesenchymal stem cells (MSCs) present the functional cell abilities which interaction is still obscure. The goal of this work was to evaluate in long term culture the proliferative and migration abilities of human MSCs prepared from endometrial, fat and bone marrow tissues. Migration ability of human MSCs was evaluated in comparison with that in HCT116, MCF7 and A-549 human epithelial cell lines. Human MSCs from different tissues on early passages showed

comparable proliferative rate which had been progressively decreased to the passage ten that corresponded to a decrease in the expression of Ki67 and Cyclin D1. MSCs motility when evaluated using the cell ability to migrate through 8 μ M filters and scratching assay to the passage ten has not been changed. The active mobility of MSCs from different tissues was associated with high production levels of N-cadherin, vimentin and loss of E-cadherin the levels of which were inverted in the HCT116, MCF7 and A-549 epithelial cells compared with those in MSCs. Our results correspond to an idea that the mechanisms of regulation of cell proliferation and mobility are not associated with each other and changed autonomously in the long term culture.

Key words: mesenchymal stem cells, proliferation, migration, markers of cell proliferation and migration.
