

УДК 576.522:57.085.23

## Использование субстратов разной жесткости для направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток крупного рогатого скота

© 2020 А.В. КОВАЛЕВА<sup>1</sup>, А.В. ТВОРОГОВА<sup>1</sup>, А.А. САИДОВА<sup>1\*</sup><sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Подольск, 142132

\*e-mail: aleena.saidova@gmail.com

Поступила в редакцию 27.04.2020 г.

После доработки 15.05.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

В работе описано изменение структур актинового цитоскелета и параметров фокальных контактов в трех классических линиях мезодермальной дифференцировки (адипоциты, остеоциты и хондроциты) мезенхимальных стволовых клеток крупного рогатого скота. Показано, что культивирование мезенхимальных стволовых клеток на жестком субстрате способствует остеогенезу благодаря увеличению размера и числа фокальных контактов и увеличению плотности структур актинового цитоскелета, отвечающих за механическое натяжение. Культивирование клеток на мягком субстрате стимулирует как адипогенез, так и хондрогенез за счет перестройки систем актинового цитоскелета, отвечающих за механическое натяжение, а также за счет уменьшения размера, числа и изменения локализации фокальных адгезий в клетке. Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи жесткости матрикса, структуры цитоскелета и предпочтительным направлением дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток

*Ключевые слова:* мезенхимальные стволовые клетки, дифференцировка, остеогенез, адипогенез, фокальные контакты, актин, матригель

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-6-87-97

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой предшественники тканей опорно-двигательного аппарата, отвечающих на механическое натяжение [1–3]. МСК широко используются в тканевой инженерии и репаративной медицине человека и животных благодаря своей низкой иммуногенности и активной продукции биоактивных молекул, которые направляют собственные клетки-предшественники в ткани [4]. Относительно простые методики выделения и быстрая дифференцировка относятся к основным преимуществам МСК, которые позволяют широко использовать их в клинической практике и исследованиях трансляционной медицины.

Механическое натяжение даже в отсутствие биохимических стимулов может стимулировать дифференцировку МСК [5]. Механическая нагрузка

в виде осциллирующего тока жидкости или циклического натяжения смещает баланс дифференцировки в сторону остеогенеза и стимулирует формирование костной и мышечной ткани, как *in vivo*, так и *in vitro* [6, 7]. На направление процесса дифференцировки влияют не только факторы, присутствующие в среде для культивирования, но и субстрат, на котором растут клетки. Так, жесткие субстраты, такие как графен и гели высокой жесткости, стимулируют остеогенную дифференцировку, в то время как мягкие субстраты, такие как продукт фибробластов, мягкие полиакриловые гели, способствуют хондрогенной дифференцировке [8, 9].

Фокальные контакты (ФК) относятся к основным системам цитоскелета клетки, отвечающим за трансформацию физических стимулов в биохимические сигнальные каскады. Формирование

*Список сокращений:* ВКМ — внеклеточный матрикс; КРС — крупный рогатый скот; МСК — мезенхимальные стволовые клетки; ФК — фокальные контакты.

ФК начинается с момента, когда интегринальный рецептор активируется белком внеклеточного матрикса (ВКМ), что приводит к быстрой сборке белков ФК, образованию комплекса «ФК–пучок актиновых филаментов» и последующей начальной стадии созревания ФК [10]. Сформированные пучки актиновых филаментов, называемые стресс-фибриллами, передают натяжение на ВКМ и наоборот [11]. Сила натяжения, генерируемая в области ФК в этом процессе, напрямую определяет его размер и количество структурных, адапторных и регуляторных белков в его составе [12]. Между стресс-фибриллами и ФК существует взаимная регуляция по принципу положительной обратной связи: натяжение стресс-фибрилл рекрутирует белки ФК в места адгезий [13], а релокализация белков ФК приводит к утолщению стресс-фибрилл и росту натяжения компонентов цитоскелета [14]. ФК контролируют степень механического натяжения МСК и их взаимодействие с субстратом, однако взаимосвязь жесткости субстрата, морфологических параметров ФК и предпочтительного направления дифференцировки МСК количественно не описана.

Целью исследования была сравнительная характеристика структур цитоскелета МСК крупного рогатого скота (КРС), культивируемых на мягком и жестком субстрате, и оценка влияния параметров цитоскелета на направление дифференцировки МСК. Показано, что МСК КРС, культивируемые на жестком субстрате, обладают повышенным остеогенным потенциалом, что связано с перестройками актинового цитоскелета, а также увеличением средней площади и числа ФК. На мягком субстрате происходит уменьшение числа и средней площади ФК, а также исчезновение структур актинового цитоскелета, отвечающих за механическое натяжение, что стимулирует процесс адипогенеза.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Культивирование клеток

В качестве объекта исследований были выбраны МСК, выделенные из костного мозга КРС. Первичные культуры МСК получали на базе Центра экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий. Клетки культивировали в пластиковых матрасах, чашках Петри со стеклянным дном и 4-луночных планшетах (Nunc, Швейцария) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Концентрация клеток в матрасе составляла от 3·10<sup>5</sup> до 3·10<sup>6</sup> клеток в 1 мл среды. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) с низким содержанием глюкозы с добавлением 10%

эмбриональной сыворотки КРС («ПанЭко», Россия), 0,09 мг/мл гентамицина, 2,5 мкг/мл амфотерицина В, 2 мМ глутамин. Клетки рассаживали в матрасы с использованием раствора трипсина–версена в соотношении 1:1 («БиолоТ», Россия). Длительность культивирования составила от 4 до 8 пассажей.

Онкогенную трансформацию клеток проверяли по уровню экспрессии основных протоонкогенов (*MYC*, *JUN* и *RAS*) методом ПЦР в реальном времени. В качестве жесткого субстрата для дифференцировки использовали очищенные покровные стекла (модуль упругости Юнга 34 кПа). В качестве мягкого субстрата для дифференцировки был выбран матригель (модуль упругости Юнга 450 Па) (Corning, США). Для посадки клеток на субстрат чашки Петри со стеклянным дном покрывали раствором матригеля и полимеризовали в течение 20 мин при 37 °С.

### Дифференцировка МСК *in vitro*

Для остеогенной дифференцировки клетки инкубировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10% FBS, 100 нМ дексаметазона (Sigma Aldrich, США), 0,5 мкМ аскорбил-2-фосфата магния (L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate) (Sigma Aldrich) и 0,2 мкМ β-глицерофосфата (Sigma Aldrich), который добавляли через 1 неделю после начала дифференцировки.

Остеогенную дифференцировку подтверждали с помощью окрашивания ализариновым красным. Для этого клетки отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 70%-ным этанолом в течение 10 мин и окрашивали 0,5%-ным раствором ализаринового красного в течение 5 мин.

Среда для адипогенной дифференцировки представляла собой DMEM с высоким содержанием глюкозы («ПанЭко», Россия), 1 мкМ дексаметазона, 100 мкМ индометацина (Sigma Aldrich), 10 мкг/мл инсулина и 500 мкМ IBMX (Sigma Aldrich). Эту среду меняли на поддерживающую среду без дексаметазона, индометацина и IBMX через 7 сут после начала индукции дифференцировки. Для подтверждения адипогенной дифференцировки клетки фиксировали 70%-ным этанолом в течение 10 мин и окрашивали 0,1%-ным раствором судана черного в течение 10 мин.

В качестве основы для хондрогенной дифференцировки использовали DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 1× ITS, 50 мг/мл аскорбата, 10 нг/мл TGF-β1 (Sigma Aldrich) и 100 нМ дексаметазона. Для подтверждения хондрогенеза клетки фиксировали 4%-ным

## Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

## Sequences of primers for the real time PCR

Ген*	Прямой праймер, 5'→3'	Обратный праймер, 5'→3'
<i>GAPDH</i>	CTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	TGGAAGATGGTGTATGGCCTTTCCATTG
<i>ACTB</i>	CGCACCCTGGCATTGTTCAT	TCCAAGGCGACGTAGCAGAG
<i>SPP1</i>	TGACAGACACACCATGAGAACCC	AGCTCTAGACTGGGCCGTAGAAG
<i>ACAN</i>	CACTGTTACCGCCACTTCCC	GACATCGTTCCTACTCGCCCT
<i>COL2A1</i>	ATCCATTGCAAACCCAAAGG	GACATCGTTCCTACTCGCCCT
<i>BGLAP</i>	ССААТГАААГСССТГАГ	ТССТССТСТГТГГСАТС
<i>PPARG</i>	CGCACTGGAATTAGATGACAGC	CACAATCTGTCTGAGGTCTGTC

\*Примечание: *GAPDH* — ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*); *ACTB* — ген β-актина; *SPP1* — ген остеопоптин (OPN); *ACAN* — ген агреггана (*ACAN*); *COL2A1* — ген альфа-1 цепи коллагена II типа (collagen type II alpha-1 chain); *BGLAP* — ген остеокальцина (OCN); *PPARG* — ген рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARγ).

\*Note: *GAPDH* — gene of *GAPDH*; *ACTB* — gene of β-actin; *SPP1* — gene of osteopontin (OPN); *ACAN* — gene of aggrecan (*ACAN*); *COL2A1* — gene of collagen type II alpha-1 chain; *BGLAP* — gene of osteocalcin (OCN); *PPARG* — gene of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARγ.

параформальдегидом и окрашивали 1%-ным раствором альцианового синего в течение 5 мин при комнатной температуре.

Клетки анализировали на инвертированном микроскопе Nikon Ti-E (Nikon, Япония) с объективами PlanApo ×20 или ×40/1.4 (фазовый контраст) с помощью цифровой камеры CoolSnapHQ (Photometrics, США). Число кластеров дифференцировки на 1, 7, 14 и 21 сутки после начала дифференцировки подсчитывали при 20-кратном увеличении и рассчитывали среднее число кластеров на 10 полях зрения для 5 стекол.

## Иммуногистохимия

Для визуализации компонентов цитоскелета в процессе дифференцировки использовали методику флуоресцентного окрашивания. Клетки фиксировали ледяным метанолом (Merck KGaA, Германия) на 21 сутки после начала дифференцировки в течение 20 мин при –20 °С и отмывали 15 мин в PBS («БиолоТ», Россия). ФК детектировали, используя в качестве первичных антител мышинные моноклональные антитела к винкулину (клон VIN-11-5; Sigma-Aldrich) в разведении 1:100 в PBS (60 мин, 37 °С), а в качестве вторичных антител использовали конъюгированные с Cy3 кроличьи антитела против IgG мыши (Invitrogen, США) в разведении 1:100 в том же буфере и при тех же условиях. Актиновые микрофиламенты окрашивали красителем ActinGreen 488 ReadyProbes (Invitrogen) по протоколу производителя.

Клетки анализировали на инвертированном микроскопе Nikon Ti-E (Nikon) с объективами PlanApo ×20 или ×40/1.4, используя цифровую

камеру CoolSnapHQ (Photometrics) со светофильтром для канала FITC.

## ПЦР в реальном времени

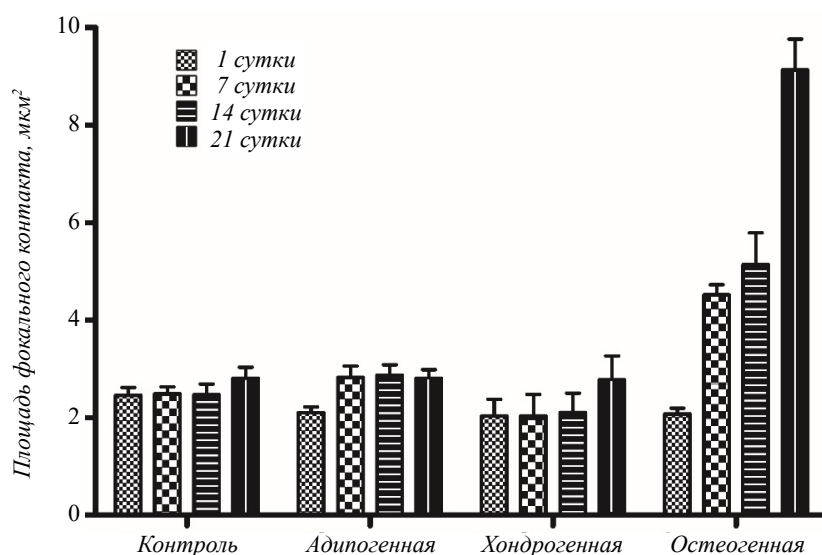
Уровень экспрессии поверхностных молекул стволовых клеток и маркеров стволовых клеток оценивали методом ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли из замороженных суспензий клеток с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США) по протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoPhotometer (Implen, Германия), чистоту выделенной РНК оценивали по соотношению оптической плотности при 260/280 нм и 260/230. кДНК транскрибировали с использованием набора ImProm-II AMV-Reverse Transcription Kit (Promega, США) по протоколу производителя. ПЦР в реальном времени проводили на термоциклере CFX96 (Applied Biosystems, США) с использованием наборов для неспецифической детекции в присутствии красителя SYBR Green («Синтол», Россия). Праймеры для анализа уровня экспрессии целевых и референсных мРНК в МСК КРС синтезированы компанией «Синтол» и приведены в табл. 1. ПЦР в реальном времени проводили по протоколу, включающему денатурацию при 95 °С в течение 10 мин и 40 циклов амплификации: 15 с при 95 °С, 30 с при 60 °С и 60 с при 72 °С. Данные нормализовали с использованием фактора нормализации по двум референсным генам, *ACTB* и *GAPDH*, по методике Vandesompele и др. [15]. Все образцы ставили в трех технических повторах и на основании полученных данных рассчитывали среднее. Один референсный образец кДНК (ген *ACTB*, кДНК

**Площадь фокальных контактов при дифференцировке МСК на жестком субстрате**  
**MSC focal adhesion areas for different types of lineage commitment on the stiff substrate**

Время, сут	Площадь ФК, мкм <sup>2</sup>			
	Контроль	Дифференцировка		
		адипогенная	хондрогенная	остеогенная
1	2,46 (0,47–21,58)	2,10 (0,34–12,3)	2,04 (0,41–15,24)	2,08 (0,21–16,54)
7	2,49 (0,44–17,08)	2,83 (0,44–263,65)	2,04 (0,54–21,40)	4,52 (1,2–26,60)
14	2,47 (0,29–24,15)	2,87 (0,39–44,51)	2,11 (0,54–21,40)	5,14 (0,86–92,72)
21	2,81 (0,78–25,69)	2,91 (0,40–22,26)	2,78 (0,52–22,18)	9,13 (1,43–85,46)

*Примечание:* Данные представлены в виде медианы (минимум–максимум).

*Note:* The data are present as a median (minimum–maximum).



**Рис. 1.** Изменение площади ФК при дифференцировке МСК по остеогенному, хондрогенному и адипогенному ряду на 1, 7, 14 и 21 сутки. Данные представлены как среднее  $\pm$  SD.

**Fig. 1.** Changes in focal adhesion area during MSC differentiation in osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineage commitment for 1, 7, 14 and 21 days. The data are present as a mean  $\pm$  SD.

выделена из МСК КРС без индукции дифференцировки, один пассаж) ставили во всех плашках и использовали как технический калибровочный контроль для объединения данных в один эксперимент. Специфичность праймеров подтверждали по анализу кривой плавления и детекции продуктов ожидаемой длины при электрофорезе в 1,5%-ном агарозном геле. Разницу в уровнях экспрессии генов оценивали с помощью критерия Манна–Уитни с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ .

#### Анализ данных

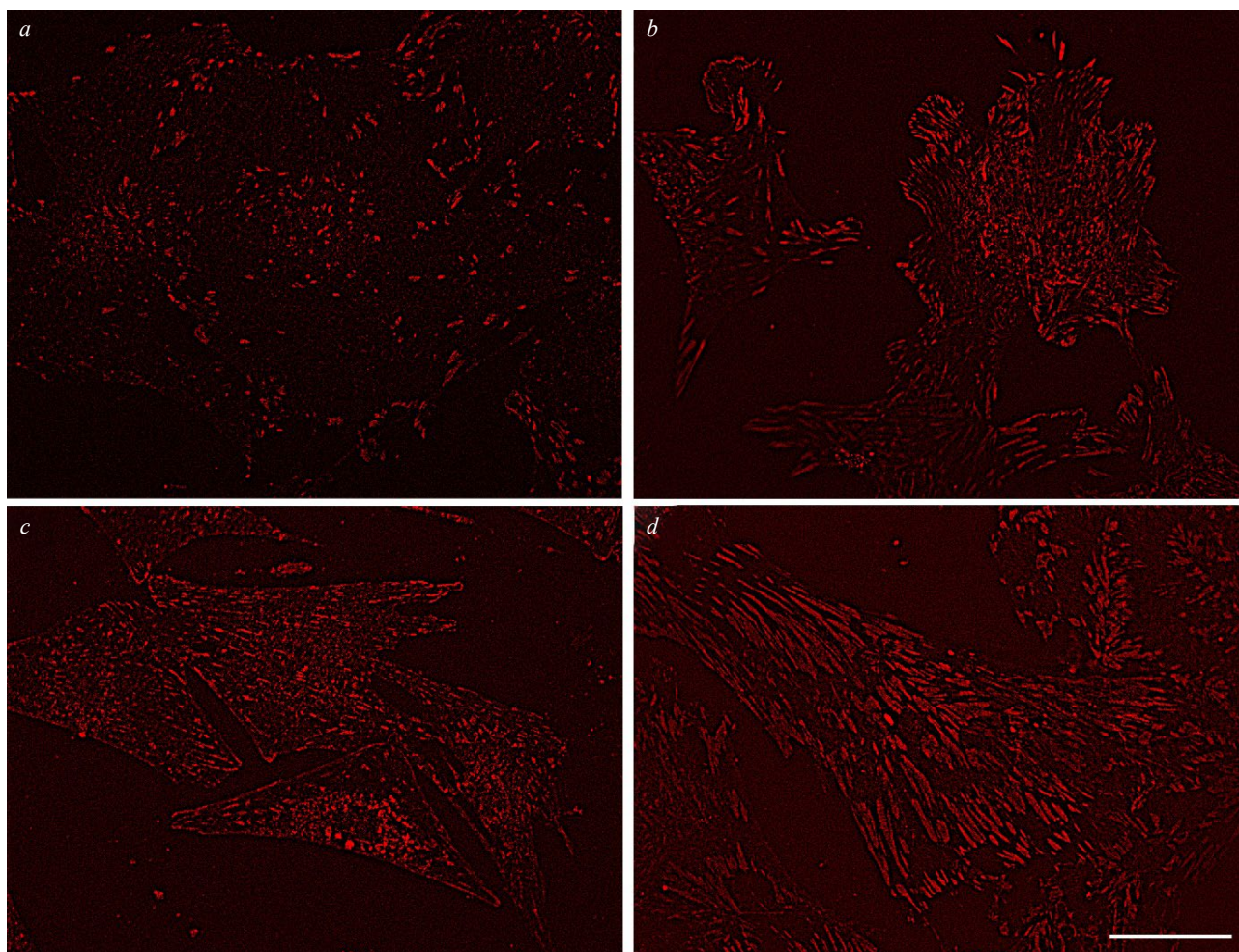
Для обработки и анализа микрофотографий использовали программу ImageJ (NIH Image, США). Статистический анализ проводили в программах SigmaPlot 3.0 (Jandel Scientific, США) и GraphPad® Prism (GraphPad Software, version 5, США). Для окончательной обработки

изображений использовали программу Photoshop CS (Adobe Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Дифференцировка МСК на жестком субстрате

В первый день после индукции дифференцировки МСК имели характерную фибробластоподобную морфологию. ФК в МСК были расположены как в теле, так и на ведущем краю клетки и представляли собой вытянутые или округлые структуры. Медианная площадь ФК в контрольных клетках в первый день составила 2,46 мкм<sup>2</sup>, что статистически не отличалось от клеток в линиях адипогенной, хондрогенной и остеогенной дифференцировки (табл. 2, рис. 1). При культивировании клеток в условиях стандартной ростовой среды локализация ФК в клетке оставалась



**Рис. 2.** Морфология ФК в МСК КРС в контроле и через 21 сут после начала индукции дифференцировки на жестком субстрате: контрольные клетки (*a*), хондрогенная (*b*), адипогенная (*c*) и остеогенная (*d*) дифференцировка. Окраска препаратов красителем Су3 (см. раздел «Условия эксперимента»); масштабный отрезок 50 мкм.

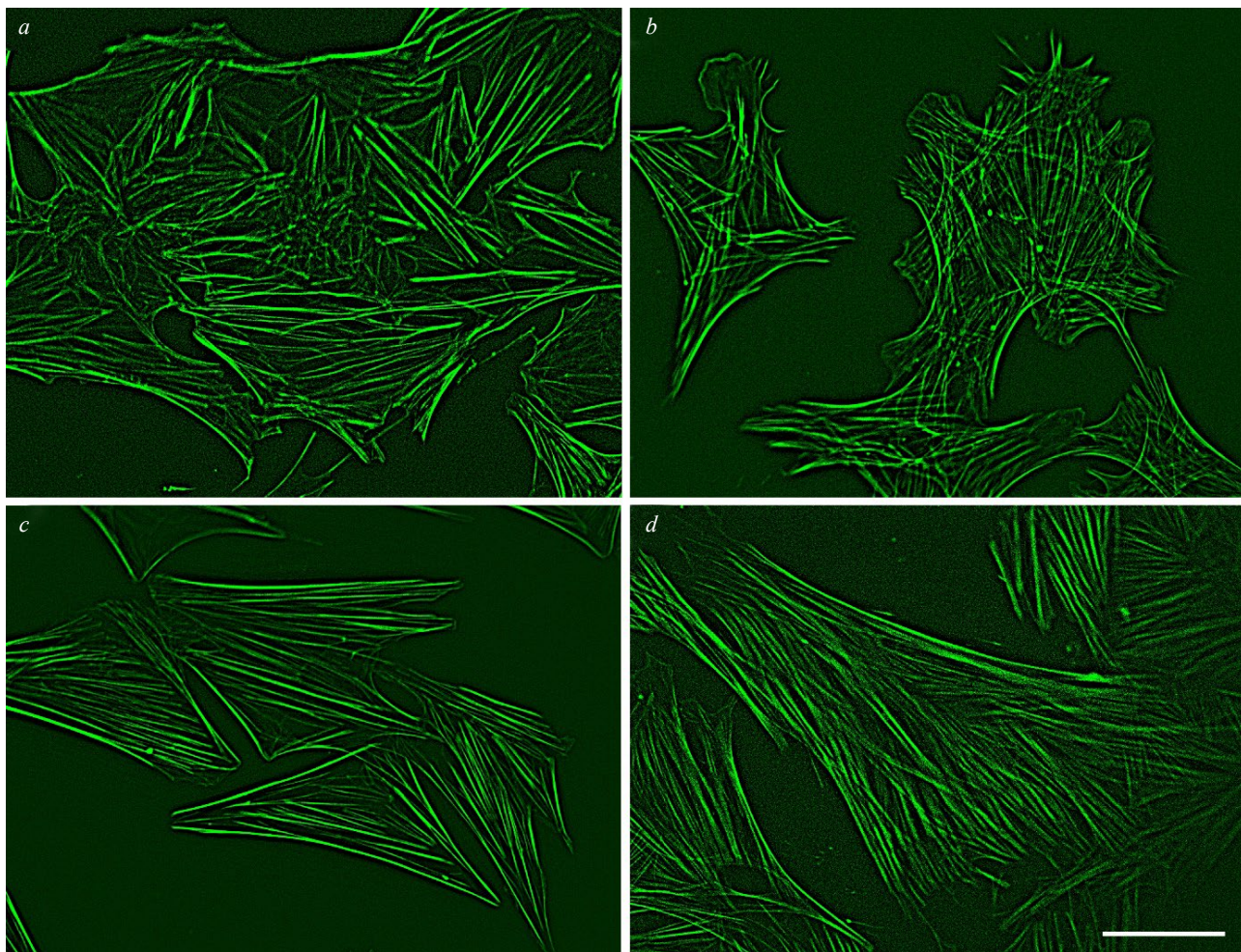
**Fig. 2.** Focal adhesion morphology in bovine MSCs in the control and 21 days after lineage commitment on the stiff substrate: control cells (*a*), chondrogenic (*b*), adipogenic (*c*) and osteogenic (*d*) commitment. The preparations were stained with Cy3 (see Experimental). Bar = 50  $\mu\text{m}$ .

неизменной (рис. 2*a*), а площадь клеточных контактов увеличивается до 2,81 мкм<sup>2</sup> к 21 суткам культивирования.

При хондрогенной дифференцировке МСК контакты в теле клеток, образующих хондрогенные шары, практически исчезали, оставаясь только в местах прикрепления клетки к субстрату (рис. 2*b*), хотя на 21 сутки наблюдалось небольшое увеличение площади ФК (до 2,78 мкм<sup>2</sup>). При адипогенной дифференцировке ФК в теле клетки практически исчезали или имели вид мелких точек, на краю клетки ФК не меняли ни площадь, ни форму (рис. 2*c*). Медиана площади ФК при адипогенной дифференцировке увеличивалась до 2,83 мкм<sup>2</sup> на 7 сутки и в дальнейшем не изменялась. Медианы площади ФК при хондрогенной и адипогенной дифференцировке значительно не отличались от контрольных значений на 1, 7, 14 и 21 сутки. При остеогенной дифференцировке

ФК оставались по всей клетке, сильно увеличиваясь в размерах. Медиана площади ФК увеличивалась в течение всего времени и к 21 суткам достигала 9,13 мкм<sup>2</sup> (рис. 2*d*). Различия для медианной площади ФК между МСК в остеогенной дифференцировке и контрольными клетками на 21 сутки были статистически достоверными ( $p < 0,01$ , непараметрический критерий Манна–Уитни).

Система актинового цитоскелета в первый день после индукции дифференцировки представлена во всех случаях тонкими короткими пучками, не имеющими регулярного расположения (рис. 3*a*). Она соответствует морфологии актиновых филаментов в недифференцированных МСК [16], когда тонкие стресс-фибриллы располагаются преимущественно вдоль длинной оси клетки. Хондрогенная дифференцировка сопровождается перестройкой актиновых филаментов, при которой в хондрогенных шарах образуется корзиноподобная



**Рис. 3.** Морфология актиновых микрофиламентов в МСК КРС в контроле и через 21 сут после начала индукции дифференцировки на жестком субстрате: контрольные клетки (a), хондрогенная (b), адипогенная (c) и остеогенная (d) дифференцировка. Окраска фиксированных препаратов красителем ActinGreen™ 488 ReadyProbes™; масштабный отрезок 50 мкм.

**Fig. 3.** Morphology of actin filaments in bovine MSCs in control and 21 days after lineage commitment on the stiff substrate: control cells (a), chondrogenic (b), adipogenic (c) and osteogenic (d) commitment. Staining of fixed specimens with ActinGreen™ 488 ReadyProbes™. Bar = 50  $\mu\text{m}$ .

структура из тонких актиновых фибрилл, а по краям клеток, прикрепленных к субстрату, формируются протяженные актиновые фибриллы (рис. 3b). При адипогенной дифференцировке актиновые пучки становятся толще с течением времени и перемещаются на края клетки, а в центре становятся длиннее (рис. 3c). В процессе остеогенной дифференцировки происходит наиболее значительная перестройка актинового цитоскелета: актиновые фибриллы смещаются к периферии и становятся толще, короткие пучки актина в теле клетки исчезают, вместо них образуется сеть толстых перекрещенных стресс-фибрилл (рис. 3d). Известно, что разрушение структур актинового цитоскелета ингибиторами полимеризации актина: латрункулином В или цитохалазином D – приводит к ускорению процессов адипогенеза и хондрогенеза и повышению уровня экспрессии соответствующих генов [17, 18], что свидетельствует о наличии петли обратной

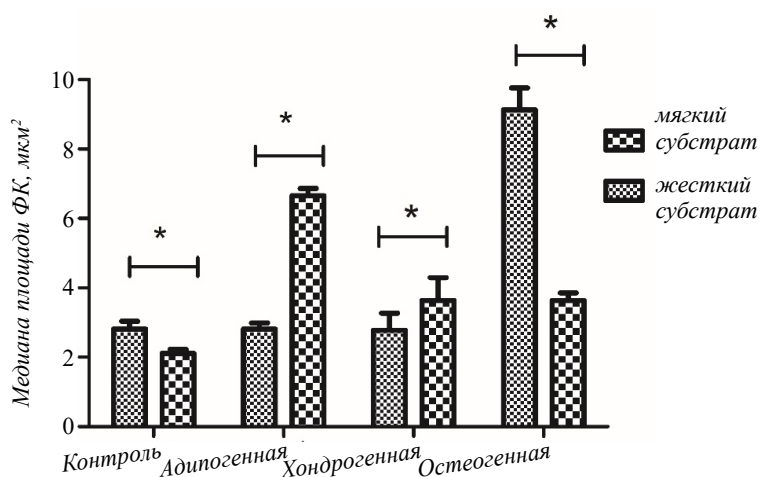
связи между системами цитоскелета и механическим натяжением и сигнальными каскадами, запускающими дифференцировку.

#### Дифференцировка на мягком субстрате

При использовании мягкого субстрата для культивирования МСК КРС в контрольных образцах ФК не отличались по форме от таковых в контроле на твердом субстрате, однако были достоверно меньше по площади. В МСК на мягком субстрате медианная площадь ФК в контроле составляла 2,08  $\mu\text{m}^2$  на 21 сутки по сравнению с 2,81  $\mu\text{m}^2$  на тот же момент для клеток на жестком субстрате. Различия для контроля на твердом и мягком субстрате статистически достоверны (непараметрический критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ) (рис. 4, табл. 3).

В отличие от жесткого субстрата, при хондрогенной дифференцировке на мягком субстрате

## СУБСТРАТЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК



**Рис. 4.** Площадь фокальных контактов в МСК КРС при различных видах дифференцировки на мягком и жестком субстрате (на 21 сутки после индукции дифференцировки). \* $p < 0,05$  (непараметрический критерий Манна–Уитни).

**Fig. 4.** The focal contacts areas in bovine MSCs for different types of lineage commitment on stiff and soft substrates (21 days after induction of lineage commitment). \* $p < 0,05$  (non-parametric Mann–Whitney test).

Таблица 3

### Площадь фокальных контактов при дифференцировке МСК на мягком субстрате

MSC focal adhesion areas for different types of lineage commitment on the soft substrate

Время, сут	Площадь ФК, мкм <sup>2</sup>			
	Контроль	Дифференцировка		
		адипогенная	хондрогенная	остеогенная
1	2,08 (0,42–21,66)	2,21 (0,34–11,15)	2,11 (0,31–14,07)	2,20 (0,42–8,37)
7	2,08 (0,70–11,75)	3,85 (0,75–45,34)	4,99 (1,45–35,44)	3,74 (0,83–19,06)
14	2,00 (0,29–14,46)	4,84 (0,73–90,98)	4,95 (1,04–39,26)	3,41 (0,62–33,49)
21	2,11 (0,44–10,58)	6,65 (0,39–76,39)	3,64 (0,52–39,16)	3,64 (0,55–38,74)

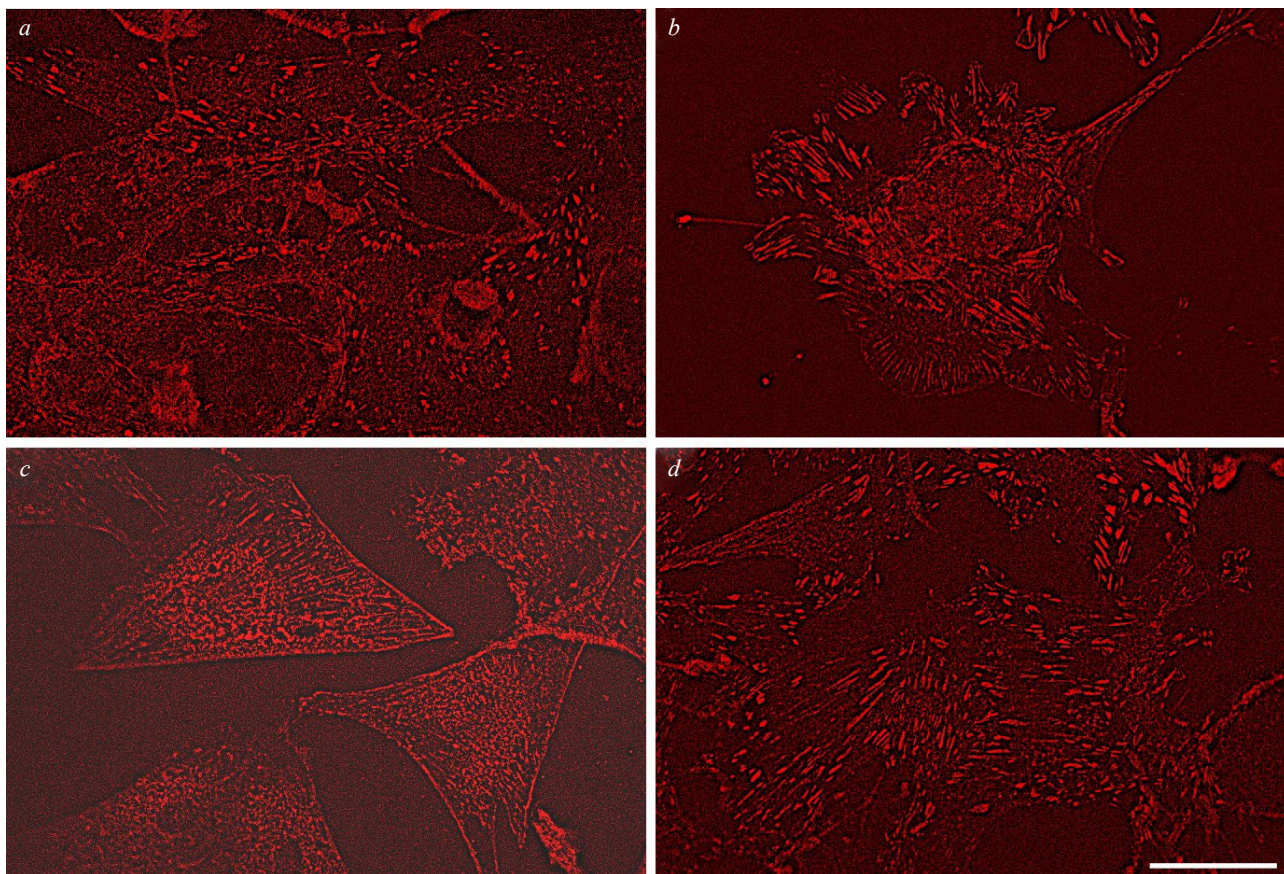
*Примечание:* Данные представлены в виде медианы (минимум–максимум).

*Note:* The data are present as a median (minimum–maximum).

площадь ФК статистически значимо возрастала по сравнению с контролем для всех точек наблюдения (непараметрический критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ); при этом наиболее крупные ФК были видны в клетках, удерживающих хондрогенный шар на субстрате (рис. 5b). При адипогенной дифференцировке МСК размеры ФК также увеличивались, причем контакты смещались к краям клетки, что, по-видимому, связано с локализацией в центре клетки липидных капель (рис. 5c). Медиана площади ФК при адипогенной дифференцировке МСК на мягком субстрате к 21 суткам достигала 6,65 мкм<sup>2</sup> (табл. 3). При остеогенной дифференцировке на мягком субстрате ФК в остеобластах были более мелкие и тусклые, чем при дифференцировке на твердом субстрате, медиана площади ФК возрастала лишь до 3,64 мкм<sup>2</sup> на 21 сутки после начала дифференцировки. Важно отметить, что уменьшение медианы площади и яркости ФК в МСК при остеогенной дифференцировке

на жестком субстрате позволяет исключить влияние химического состава матригеля. Матригель содержит множество белков ВКМ, включая ламинин, коллаген IV и гепарансульфат, а специфическое связывание этих компонентов ВКМ с рецепторами интегринов запускает созревание ФК [10]. Однако сигнальные каскады, исходящие от рецепторов интегринов, универсальны. Их активация характерна для любого варианта контактов клетки и матрикса. В таком случае уменьшение размера ФК в остеобластах и увеличение в адипоцитах на мягком субстрате обусловлено изменением жесткости субстрата, но не его химическим составом [19].

Система актиновых фибрилл в контрольных клетках не отличалась на жестком и мягком субстрате. Во всех линиях дифференцировки характер перестройки актинового цитоскелета МСК на мягком субстрате был сходен с перестройками в МСК на жестком субстрате. Следует сказать, что в случае остеогенной дифференцировки МСК



**Рис. 5.** Морфология ФК в МСК КРС в контроле и через 21 сут после начала индукции дифференцировки на мягком субстрате: контрольные клетки (а), хондрогенная (b), адипогенная (c) и остеогенная (d) дифференцировка. Окраска препаратов красителем Cy3 (см. раздел «Условия эксперимента»); масштабный отрезок 50 мкм.

**Fig. 5.** Morphology of FA in bovine MSCs in control and 21 days after lineage commitment on a soft substrate: control cells (a), chondrogenic (b), adipogenic (c) and osteogenic (d) commitment. The preparations were stained with Cy3 (see Experimental). Bar = 50  $\mu$ m.

на мягком субстрате количество стресс-фибрилл и их толщина были меньше, чем для жесткого субстрата (рис. S1, дополнительный материал).

### Морфология дифференцировки

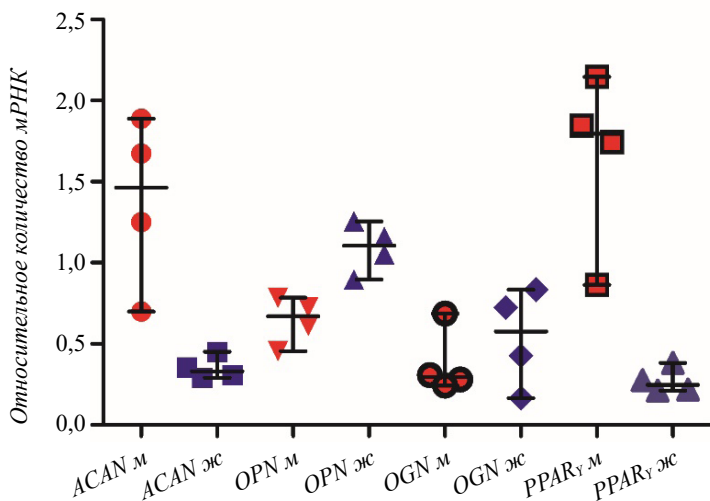
В условиях остеогенной дифференцировки МСК КРС начинали экспрессировать маркеры остеобластов остеопонтин (OPN, ген *SPP1*) и остеокальцин (OCN, ген *BGLAP*) (рис. 6), однако уровень экспрессии мРНК обоих генов был выше в МСК КРС на жестком субстрате. Медиана относительного количества кДНК гена *SPP1* в МСК на жестком субстрате составила 1,105 по сравнению с 0,669 в МСК на мягком субстрате. Для гена *BGLAP* были характерны те же различия (медиана относительного количества кДНК *BGLAP* составила 0,575 в МСК на жестком субстрате против 0,294 на мягком), которые были статистически значимы ( $p = 0,02$ ). В процессе адипогенной дифференцировки уровень экспрессии маркера адипоцитов *PPAR $\gamma$*  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ;

ген *PPARG*) оказался выше в МСК на мягком субстрате. Медиана относительного количества кДНК *PPARG* составила 1,795 в МСК на мягком субстрате по сравнению с 0,185 для жесткого субстрата ( $p = 0,02$ ). Экспрессия гена *ACAN* (aggrecan core protein), характерного для хондроцитов, также была повышена в МСК на мягком субстрате: 1,463 против 0,246 для МСК на жестком субстрате ( $p = 0,01$ ).

На морфологическом уровне дифференцировка по остеогенному ряду прошла на жестком субстрате более успешно, чем на мягком субстрате. Через 21 сут после начала дифференцировки окрашивание ализариновым красным было более интенсивным в МСК на стекле (рис. 7a, d) и число кластеров остеобластов/остеоцитов в 1 поле зрения при 20-кратном увеличении составило  $5,32 \pm 0,47$  (по сравнению с  $2,00 \pm 0,13$  кластеров на 1 поле зрения для МСК на мягком субстрате) (рис. S2a, дополнительный материал).

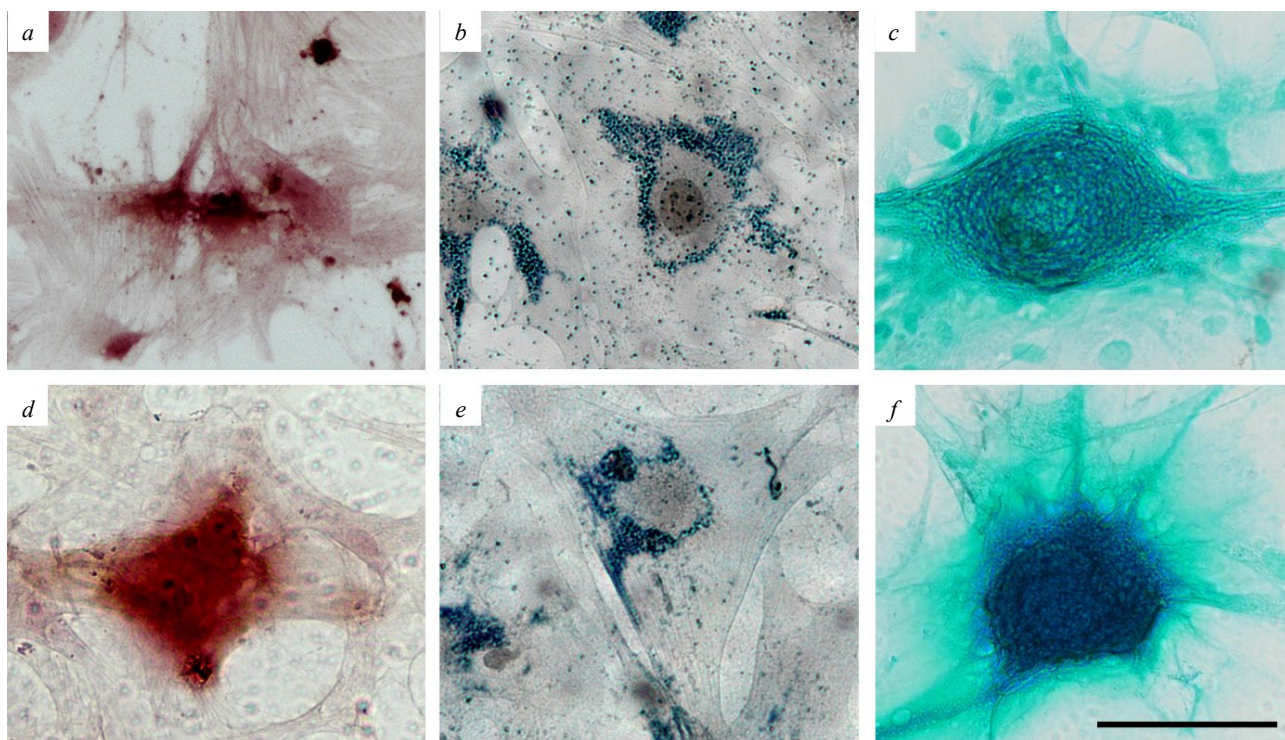
Напротив, окрашивание суданом черным для МСК, дифференцирующихся по адипогенному





**Рис. 6.** Паттерны экспрессии маркеров адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировки в МСК КРС, культивируемых на мягком (м) или жестком (ж) субстрате. Данные приведены в виде медианы и разброса для 4 биологических повторов. В качестве референс-генов использовали *ACTB* и *GAPDH*.

**Fig. 6.** Expression patterns of adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation genes in bovine MSCs cultured on soft or stiff substrates. Data are present as a median  $\pm$  range for 4 biological replicates. *ACTB* and *GAPDH* were used as reference genes.



**Рис. 7.** Морфология МСК КРС, культивируемых на мягком и жестком субстрате. Окраска ализариновым красным для остеогенной дифференцировки (a, d), суданом черным для адипогенной дифференцировки (b, e), альциановым синим для хондрогенной дифференцировки (c, f). Масштабный отрезок 50 мкм.

**Fig. 7.** Bovine MSC morphology in differentiation on stiff and soft substrates. Staining with Alizarin red for osteogenic commitment (a, d), Sudan black for adipogenic commitment (b, e) and Alcian blue for chondrogenic commitment (c, f). Bar = 50  $\mu$ m.

ряду, было более интенсивным на мягком субстрате (рис. 7b, e). Среднее число кластеров адипоцитов с яркими липидными гранулами судана черного также оказалось несколько выше для МСК КРС на мягком субстрате ( $3,96 \pm 0,42$  против  $2,75 \pm 0,20$  на жестком субстрате) (рис. S2b, дополнительный материал). Окраска альциановым синим также была более интенсивной для МСК КРС на мягком субстрате (рис. 7c, f), но среднее число

кластеров хондроцитов на одно поле зрения не отличалось для МСК КРС на мягком и жестком субстрате по крайней мере через 21 сут после начала хондрогенной дифференцировки.

Учитывая эти данные, мы предположили, что при дифференцировке МСК КРС на мягком и жестком субстрате у клеток появляются отличия в структуре ФК с субстратом. Известно, что количество и размер ФК возрастает в процессе

остеогенной дифференцировки [19, 20] и уменьшается в процессе адипогенной [21]. В этом механизме присутствует петля обратной связи: многочисленные и плотные ФК стимулируют остеогенез, тогда как разреженные и мелкие ФК (или их отсутствие) необходимы для адипогенеза [22, 23]. Таким образом, нами показано, что при культивировании МСК КРС на мягком и жестком субстрате паттерны их дифференцировки различаются, причем разница обусловлена морфологическими параметрами ФК и структур актинового цитоскелета, отвечающих за механическое натяжение.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки модели направленной дифференцировки МСК при помощи изменения жесткости субстрата в отсутствие дополнительных биохимических стимулов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания № 075-01250-20-01.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sumanasinghe R.D., Bernacki S.H., Lobo E.G. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Eng.*, 2006, 12(12), 3459–3465. doi: 10.1089/ten.2006.12.3459
2. Ge J., Burnier L., Adamopoulou M., et al. RhoA, Rac1, and Cdc42 differentially regulate  $\alpha$ SMA and collagen I expression in mesenchymal stem cells. *J. Biol. Chem.*, 2018, 293(24), 9358–9369. doi: 10.1074/jbc.RA117.001113
3. Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*, 1970, 3(4), 393–403. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
4. Meirelles Lda. S., Fontes A.M., Covas D.T., Caplan A.I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2009, 20(5-6), 419–427. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002
5. Saidova A.A., Vorobjev I.A. Lineage commitment, signaling pathways, and the cytoskeleton systems in mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2020, 26(1), 13–25. doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0250
6. Gurkan U.A., Akkus O. The mechanical environment of bone marrow: a review. *Ann. Biomed. Eng.*, 2008, 36(12), 1978–1991. doi: 10.1007/s10439-008-9577-x
7. Menuki K., Mori T., Sakai A., et al. Climbing exercise enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation with high expression of PTH/PTHrP receptor in bone marrow cells. *Bone*, 2008, 43(3), 613–620. doi: 10.1016/j.bone.2008.04.022
8. Munoz-Pinto D.J., Jimenez-Vergara A.C., Hou Y. Osteogenic potential of poly(ethylene glycol)-poly(dimethylsiloxane) hybrid hydrogels. *Tissue Eng. Part A*, 2012, 18(15–16), 1710–1719. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0348
9. Guo C., Kaufman L.J. Flow and magnetic field induced collagen alignment. *Biomaterials*, 2007, 28(6), 1105–1114. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.010
10. Schiller H.B., Hermann M.R., Polleux J.  $\beta$ 1- and  $\alpha$ v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat. Cell Biol.*, 2013, 15(6), 625–636. doi: 10.1038/ncb2747
11. Naumanen P., Lappalainen P., Hotulainen P. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J. Microsc.*, 2008, 231(3), 446–454. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02057.x
12. Goffin J.M., Pittet P., Csucs G., et al. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. *J. Cell Biol.*, 2006, 172(2), 259–268. doi: 10.1083/jcb.200506179
13. Yamashita H., Ichikawa T., Matsuyama D., et al. The role of the interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinxin  $\alpha$  in sensing the stiffness of the extracellular matrix. *J. Cell Sci.*, 2014, 127(9), 1875–1886. doi: 10.1242/jcs.133645
14. Fabry B., Klemm A.H., Kienle S. Focal adhesion kinase stabilizes the cytoskeleton. *Biophys. J.*, 2011, 101(9), 2131–2138. doi: 10.1016/j.bpj.2011.09.043
15. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 2002, 3, research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
16. Rodríguez J.P., González M., Ríos S., Cambiasso V. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.*, 2004, 93(4), 721–731. doi: 10.1002/jcb.20234
17. Sonowal H., Kumar A., Bhattacharyya J., et al. Inhibition of actin polymerization decreases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *J. Biomed. Sci.*, 2013, 20, 71. doi: 10.1186/1423-0127-20-71
18. Lim Y.B., Kang S.S., Park T.K., et al. Disruption of actin cytoskeleton induces chondrogenesis of mesenchymal

- cells by activating protein kinase C-alpha signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 273(2), 609–613. doi: 10.1006/bbrc.2000.2987
19. McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M., Bhadriraju K., Chen C.S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell.*, 2004, 6(4), 483–495. doi: 10.1016/s1534-5807(04)00075-9
  20. Trappmann B., Gautrot J.E., Connelly J.T., et al. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat. Mater.*, 2012, 11(7), 642–649. doi: 10.1038/nmat3339
  21. Luo W., Shitaye H., Friedman M., et al. Disruption of cell-matrix interactions by heparin enhances mesenchymal progenitor adipocyte differentiation. *Exp. Cell Res.*, 2008, 314(18), 3382–3391. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.07.003
  22. Liu Y., Medda R., Liu Z., et al. Nanoparticle tension probes patterned at the nanoscale: impact of integrin clustering on force transmission. *Nano Lett.*, 2014, 14(10), 5539–5546. doi: 10.1021/nl501912g
  23. Frith J.E., Mills R.J., Cooper-White J.J. Lateral spacing of adhesion peptides influences human mesenchymal stem cell behaviour. *J. Cell Sci.*, 2012, 125, 317–327. doi: 10.1242/jcs.087916

## Substrates with Different Rigidity for Directed Differentiation of Bovine Mesenchymal Stem Cells

A.V. KOVALEVA<sup>1</sup>, A.V. TVOROGOVA<sup>1</sup>, A.A. SAIDOVA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Podolsk, 142132 Russia

\*e-mail: aleena.saidova@gmail.com

Received April 27, 2020

Revised May 15, 2020

Accepted December 1, 2020

**Abstract**—The article describes the change in the structures of the actin cytoskeleton and the parameters of focal adhesions during three major mesoderm lineage commitments (adipocytes, osteocytes and chondrocytes) of bovine mesenchymal stem cells. It was shown that the cultivation of mesenchymal stem cells on a rigid substrate is a favorable factor for osteogenesis due to an increase in the size and number of focal adhesions, as well as the number of actin cytoskeleton structures responsible for mechanical tension. Cultivation of cells on a soft substrate stimulates both adipogenesis and chondrogenesis due to restructuring the actin cytoskeleton responsible for mechanical tension, as well as reducing the size, number and location of focal adhesions. These data establish a relationship between matrix rigidity, cytoskeletal structure and preferred directions of differentiation of mesenchymal stem cells..

**Key words:** mesenchymal stem cells, differentiation, osteogenesis, adipogenesis, focal adhesions, actin, matrigel

**Funding**—The study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (State Assignment no. 075-01250-20-01).

**Supplementary material**—The online version of this paper contains supplementary material available free of charge at <http://www.biotechnology-journal.ru>

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-6-87-97