

УДК 57.034:577.217.5+57.085.23

## МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ОРГАНИЗУЮТ РИТМ СИНТЕЗА БЕЛКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКЗОГЕННОГО СИНХРОНИЗИРУЮЩЕГО СИГНАЛА

© 2012 г. В. Я. Бродский, А. В. Васильев, В. В. Терских, Н. Д. Звездина, В. И. Фатеева, Л. А. Мальченко, Е. В. Киселева, Э. И. Буеверова

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН*

*119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

*E-mail: brodsky.idb@bk.ru*

Поступила в редакцию 28.05.11 г.

Окончательный вариант получен 29.11.11 г.

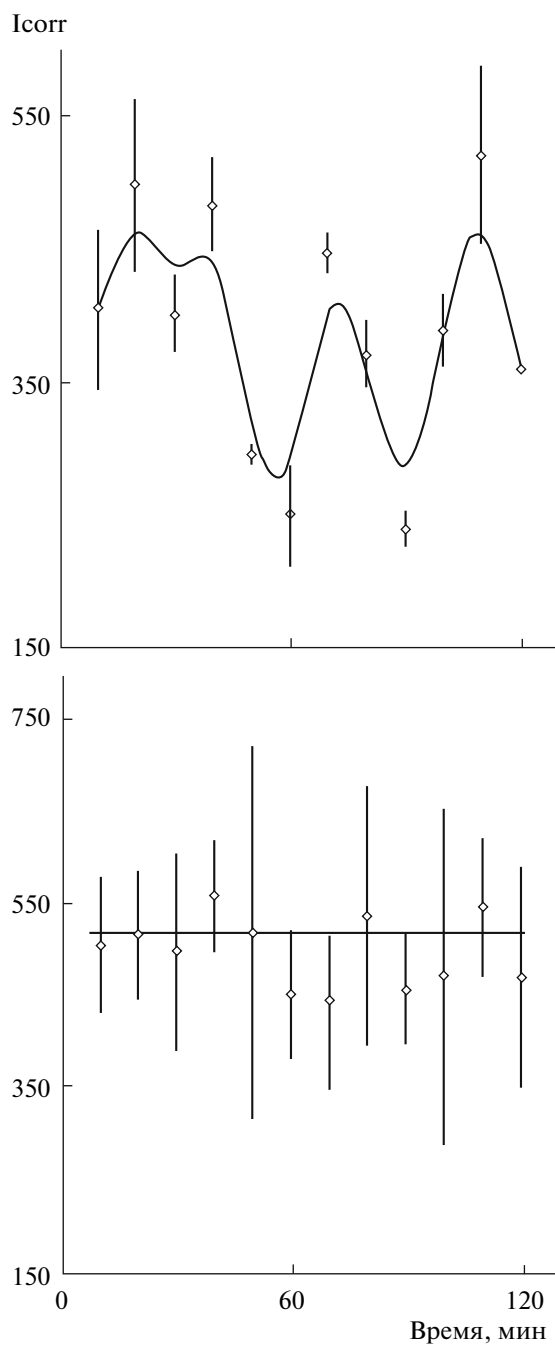
Изучали плотные 5-часовые культуры гепатоцитов крысы и такие же по плотности культуры мезенхимных стромальных клеток (МСК), выделенных из жировой ткани человека или из костного мозга крысы. Клетки содержали в бессывороточной среде на стеклах, покрытых коллагеном. В отличие от гепатоцитов, в МСК не обнаружен ритм синтеза белка. После введения в среду с культурами МСК мелатонина (2 нМ, 5 мин) выявляется ритм. Опыты с хелатором цитоплазматического кальция ВАРТА-АМ и ингибитором протеинкиназ Н7 показали, что механизм организации ритма в МСК кальций-зависимый и определяется фосфорилированием белков.

*Ключевые слова:* мезенхимные стромальные клетки, гепатоциты, межклеточные взаимодействия, окологасовые ритмы, ритм синтеза белка.

В плотных культурах гепатоцитов и кератиноцитов обнаружен суммарный популяционный ритм синтеза белка (последние работы: Бродский и др., 2006, 2009, 2011). Ритм наблюдали вскоре после смены среды, что показывало самосинхронизацию колебаний интенсивности синтеза в результате прямых межклеточных взаимодействий. В не взаимодействующих клетках (например, в разреженных культурах) ритм не выявлялся. В опытах с агонистами и антагонистами внутриклеточных процессов была обоснована многоступенчатая последовательность взаимодействий между клетками, приводящих к ритму синтеза белка. Сигнал, действуя на специфические рецепторы клеточной мембраны, включал цепь процессов в цитоплазме, приводящих к синхронизации фаз индивидуальных колебаний. Задача новой работы – изучение кинетики синтеза белка в мезенхимных стромальных клетках (МСК) при действии мелатонина. Как и в работах с эпителиальными клетками, ритм синтеза белка в МСК мог быть показателем прямых межклеточных взаимодействий. По некоторым данным (Bizik et al., 2004; Vahegi et al., 2009), фибробласты, в отличие от эпителия, не контактируют друг с другом. Сохраняются ли в фибробластоподобных МСК прямые межклеточные взаимодействия? Способны ли МСК реагировать на внешний синхронизирующий сигнал?

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В основных опытах исследовали МСК, выделенные из биоптатов жировой ткани, полученных после абдоминальной пластики (Киселева и др., 2009). Клетки культивировали в среде ДМЕМ с 10% сыворотки, 5 мкг/мл инсулина, 10 мкг/мл трансферрина и 10 нг/мл селенита натрия. Смену среды осуществляли каждые 3-е суток. По достижении монослоя клетки пассировали с использованием растворов 0.05% трипсина (Панэко) и Версена (Панэко). На 3–4 пассаже клетки замораживали для долгосрочного хранения (при  $-196^{\circ}\text{C}$ ), в качестве криопротектора использовали 10% ДМСО. Для экспериментов нашей работы клетки размораживали и культивировали в течение 2–3 недель. В работе использовали клетки 8–12 пассажей. Затем клетки снимали с пластика по стандартной методике с помощью растворов Версена и трипсина, клетки суспендировали, центрифугировали 10 мин при 200 g. Клеточный осадок ресуспендировали в бессывороточной среде (среда 199 с добавлением 0.5 мкг/мл инсулина (Sigma) и 0.2 мг/мл альбумина для клеточных культур (Sigma) и далее содержали в этой среде. Суспензию, содержащую около  $10^6$  клеток в мл среды, вносили в чашку Петри с 30 мл среды над стеклами, покрытыми коллагеном. Через 3 часа культуры отмывали и переносили в свежую среду. Еще через 2 часа культуры вновь отмывали и через 15–60 мин ис-



Кинетика синтеза белка в плотных культурах гепатоцитов крысы (вверху) и в таких же по плотности культурах мезенхимных стромальных клетках человека, выделенных из жировой ткани (внизу). Результаты двух опытов.

По оси абсцисс — время в мин. По оси ординат Icorr — включение  $^3\text{H}$ -лейцина в белки с поправкой на пул свободного лейцина.

Каждые 10 мин в течение 2-х ч брали пробы по 3 культуры и в каждой культуре отдельно определяли Icorr (см. Методы).

Прямые линии — среднее Icorr для каждого опыта (36 культур).

следовали кинетику синтеза белка. В части опытов исследовали МСК из костного мозга крысы (Буеверова и др., 2008).

Метод исследования кинетики синтеза белка детально изложен ранее (Brodsky et al., 1992; Бродский и др., 2006). Пробы, по три культуры каждая, брали последовательно через 10 мин в течение 2 ч. Каждую культуру инкубировали отдельно в течение 10 мин при  $37^\circ\text{C}$  в среде с  $^3\text{H}$ -лейцином (25–30 мкCi/мл, специфическая молярная активность 70–100 Ci/ммоль). Радиоактивность лейцина в белках и небелковой кислоторастворимой фракции, т.е. свободного лейцина в клетках измеряли в каждой культуре, используя сцинтилляционный счетчик LKB 1214 Rackbeta (Швеция). Рассчитывали относительное включение лейцина в белки с поправкой на пул свободного лейцина (формулу для расчетов см. в цитированных выше статьях). Каждый опыт ставили на культурах одной крысы.

Мелатонин в дозе 2 нМ вводили в среду с культурами на 5 мин, после чего культуры отмывали и переносили в свежую среду. Условия опытов с хелатором кальция ВАРТА-АМ и ингибитором протеинкиназы Н7 изложены в Результатах. Достоверность изменений интенсивности синтеза белка оценивали статистически.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении 1–3-суточных плотных культур гепатоцитов, через 10–15 мин после их отмывания и помещения в свежую бессывороточную среду выявляли окологоризонтальный ритм синтеза белка (ссылки во Введении). Такой же ритм обнаружен и в 5-часовых культурах; различия между максимумами и минимумами кривой высоко достоверны (например, рисунок). На этой кривой обнаружены два периода. В таких же по плотности культурах МСК ритм не выявляется: все точки аппроксимируются прямой. Но если в среду с такими культурами ввести на 5 мин 2 нМ мелатонина, затем культуры отмыть и перенести в свежую среду без мелатонина, ритм синтеза белка выявляется (таблица). Различия между максимумами и минимумами кинетической кривой не менее достоверны, чем для культур гепатоцитов. Принципиальные отличия между клетками в том, что гепатоциты самосинхронизируются без какого-либо экзогенного сигнала — аутокринно, а для синхронизации МСК требуется экзогенный сигнал, введенный в среду. Такие же результаты получены нами при изучении МСК, выделенных из костного мозга крысы.

Ранее был изучен внутриклеточный механизм синхронизации гепатоцитов и кератиноцитов (ссылки во Введении). В опытах с хелатором цитоплазматического кальция ВАРТА-АМ было показано, что блокирование выброса ионов кальция из внутренних депо ликвидирует ритм в плотных

Примеры кинетики Isoгг – включения  $^3\text{H}$ -лейцина в белки поправкой на пул свободного лейцина (срм) в плотные культуры с 10-мин интервалами в течение 2-х часов. В таблице приведены максимумы (макс) и минимумы (мин) кривой<sup>1</sup>

Объект	Контроль		Мелатонин		ВАРТА-АМ или Н7 предобработка до мелатонина	
	макс	мин	макс	мин	макс	мин
Гепатоциты	498 ± 66	250 ± 44	561 ± 46	382 ± 06		
	416 ± 15	239 ± 14	674 ± 76	400 ± 32		
	520 ± 68		566 ± 65			
Мезенхимные стромальные клетки	Все точки кривой достоверно не отличаются друг от друга и от средней для всего опыта			204 ± 24		
			437 ± 52	254 ± 07		
			458 ± 14	322 ± 30		
			624 ± 54	214 ± 16		
			2285 ± 106	854 ± 91	Все точки кривой достоверно не отличаются друг от друга и от средней для всего опыта	
			1984 ± 43	1233 ± 112		

<sup>1</sup> На каждой строке слева – Isoгг ± ошибка на первом максимуме кинетической кривой, правее – соответствующий минимум, строкой ниже – следующий максимум и минимум, строкой ниже – следующие значения той же кривой. Кривая может начинаться с минимума.

культурах и снимает синхронизирующий эффект внешних сигналов – ганглиозидов или моноаминов. Инактивация протеинкиназ ингибитором Н7 также ликвидировала ритм синтеза белка в гепатоцитах и кератиноцитах. Также и в исследовании МСК блокирование изменений кальция ВАРТА-АМ (20 мкМ, 1 час) с последующим введением в среду 2 нМ мелатонина полностью снимало синхронизирующий эффект мелатонина. Таким же был результат предобработки культур МСК ингибитором протеинкиназ (в основном, протеинкиназы С) с помощью Н7 (40 мкМ, 1 час).

Какова возможная причина различий организации кинетики синтеза белка в гепатоцитах и МСК? В эпителии нарушение межклеточных связей включает апоптоз (Nagrer et al., 2003). Напротив, экспериментальная инициация контактов между фибробластами приводит к их гибели (Bizik et al., 2004). Влияние связей между фибробластоподобными МСК на их жизнеспособность не ясна. По нашему критерию прямых межклеточных взаимодействий – ритму синтеза белка – такие связи в МСК, во всяком случае, ослаблены сравнительно с эпителием. Но на внешний синхронизирующий сигнал МСК реагируют, причем механизм их синхронизации такой же, как в эпителии: сигнал на мембране → изменения ионов кальция → стимуляция протеинкиназ → фосфорилирование белков.

Благодарим В.С. Михайлова, В.Н. Самирского и В.И. Старостина и О.В. Паюшину за замечания. Авторы благодарят РФФИ за поддержку.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский В.Я., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Механизм прямых межклеточных взаимодействий. Самоорганизация ритма синтеза белка // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 4. С. 384–393.
- Бродский В.Я., Голиченков В.А., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Мелатонин синхронизирует ритм синтеза белка в культурах гепатоцитов как агонист внутриклеточного кальция и протеинкиназ // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 3. 231–236.
- Бродский В.Я., Терских В.В., Васильев А.В., Звездина Н.Д., Воротеляк Е.А., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Самоорганизация ритма синтеза белка в культурах NaCaT кератиноцитов человека // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 4.
- Буеверова Э.И., Брагина Е.В., Молчанова Е.А. Неадгезивные популяции мезенхимных стромальных клеток // Онтогенез. 2008. Т. 39. С. 420–429.
- Киселева Е.В., Черных Э.С., Воротеляк Е.А., Воложин А.И., Васильев А.В., Терских В.В. Сравнение дифференцировочных потенциалов фибробластоподобных клеток стромы костного мозга, жировой ткани, волосяной луковицы и дермальных фибробластов // Цитология. 2009. Т. 51. С. 12–19.
- Bizik J., Kanhuri E., Ristimaki A., Taieb A., Vaatalo H., Lubitz W., Vaheri A. Cell-cell contacts trigger programmed necrosis and induce cyclooxygenase-2 expression // Cell Death Differ. 2004. V. 11. P. 183–95.

*Brodsky V.Y., Boikov P.Y., Nechaeva N.V., Yurovitsky Y.G., Novikova T.E., Fateeva V.I., Shevchenko N.A.* The rhythm of protein synthesis does not depend on oscillations of ATP level // *J. of Cell Science*. 1992. V. 103. P. 363–370.

*Harper N., Hughes M.A., Farrow S.N., Cohen G.M., MacFarlane M.* Protein kinase C modulates tumor-necrosis

factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 44338–97.

*Vaheri A., Enzerink A., Rasanen K., Salmenpera P.* Nemo1, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer // *Exp Cell Res.* 2009. V. 315. P. 1633–38.

## Mesenchymal Stromal Cells Synchronize the Rhythm of Protein Synthesis under the Effect of an Exogenous Signal

V. Ya. Brodsky, A. V. Vasil'ev, V. V. Terskikh, N. D. Zvezdina, V. I. Fateeva,  
L. A. Mal'chenko, E. V. Kiseleva, and E. I. Bueverova

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: brodsky.idb@bk.ru*

**Abstract**—A comparative study was performed of dense 5-hour cultures of rat hepatocytes and equal-density cultures of mesenchymal stromal cells (MSC) isolated from human adipose tissue of rat bone marrow. The cells were grown on collagen-coated glass slides in serum-free medium. Unlike in hepatocytes, no rhythm of protein synthesis was initially revealed in MSC, but such a rhythm manifested itself when the culture medium was supplemented with melatonin (2 nM, 5 min). The results of experiments with cytoplasmic calcium chelator BAPTA-AM and protein kinase inhibitor H7 indicate that the mechanism of protein synthesis synchronization in MSC consists in calcium-dependent phosphorylation of cell proteins.

**Keywords:** mesenchymal stromal cells, hepatocytes, cell interactions, circadian rhythms, protein synthesis rhythm.

---

Сдано в набор 11.01.2012 г.	Подписано к печати 03.04.2012 г.	Формат бумаги 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>
Цифровая печать	Усл. печ. л. 9.0	Уч.-изд. л. 9.0
	Тираж 96 экз.	Бум. л. 4.5
		Зак. 146

---

Учредитель: Российская академия наук,  
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

---

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90  
Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”  
Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6