

На правах рукописи

СПИЧКИНА
Ольга Георгиевна

**Обогащение культуры кератиноцитов человека стволовыми клетками
путем селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса**

03.00.25. Гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2008

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последние годы большой интерес вызывают исследования, связанные с изучением и применением стволовых клеток в медицине для заместительной клеточной терапии поврежденных тканей. При этом до сих пор ведется много дискуссий на тему, что же понимать под термином «стволовые клетки», и можно ли их использовать в клинике. Кроме клинического применения, наличие такой линии способствовало бы изучению механизмов регуляции дифференцировки клеток, а также изучению влияния на нее различных факторов. Для того чтобы детально их изучать, необходимо наличие постоянной линии стволовых клеток с тем, чтобы исключить вариации каких-либо признаков, которые можно наблюдать при использовании материала от разных доноров. Кроме того, такая линия являлась бы постоянным источником материала для клеточных технологий. На данный момент из взрослого организма удается выделять в чистом виде только гемопоэтические мезенхимные стволовые клетки. Однако линии стволовых клеток взрослого организма до сих пор не созданы.

Было обнаружено, что в ряде тканей взрослого организма существуют ниши, в которых находятся стволовые клетки, например, в коже в базальном слое кератиноцитов. Кожный покров человека и животных постоянно обновляется за счет пролиферации кератиноцитов и их последовательной дифференцировки по направлению от базальной мембраны к поверхности кожи. Согласно существующим представлениям покоящиеся стволовые клетки эпидермиса сосредоточены у базальной мембраны и в волосяных фолликулах. Они дают начало так называемым транзиторным клеткам, способным интенсивно размножаться, за счет чего эпидермис постоянно обновляется. После нескольких делений они вступают на путь дифференцировки. В результате образуются разные слои эпидермиса, содержащие кератиноциты, находящиеся на разных уровнях дифференцировки (Хэм, Кормак, 1983).

При переводе в культуру кератиноцитов базального слоя эпидермиса они способны размножаться и воспроизводить такой же процесс последовательной дифференцировки, как это происходит в коже. Образуется многослойный пласт эпидермальных клеток, который может быть использован в технологиях заместительной клеточной терапии (Limat, Klein, 1993; Romero et al., 1999).

В связи с тем, что доказано существование стволовых клеток в коже человека, представляется актуальным получить популяцию кератиноцитов, обогащенную стволовыми клетками, которые обладают большим пролиферативным потенциалом. Пул таких клеток можно было бы использовать как для фундаментальных исследований, так и для применения

в заместительной клеточной терапии. Предполагается, что это позволит повысить эффективность технологий восстановления структурной и функциональной целостности кожного покрова.

Решить задачу получения линии стволовых клеток или, по крайней мере, обогащения ими гетерогенной популяции базальных кератиноцитов, можно было бы осуществить путем выявления стволовых клеток методом проточной цитометрии с помощью специфических маркеров. В литературе описан ряд подобных маркеров (Michel et al., 1996; Pellegrini et al., 2001). Однако на наш взгляд они не являются строго специфичными для этого типа клеток, так как они носят скорее количественный характер и найдены и в клетках других тканей (Fradette et al., 1998; Reis-Filho et al., 2002). Кератиноциты разной степени дифференцировки различаются лишь только по величине содержания в них маркерных белков (Moles, Watt, 1997; Yang et al., 1998).

В связи с отсутствием строго специфичных маркеров необходимо искать другие экспериментальные подходы для четкого выделения этих клеток или, по крайней мере, для обогащения ими культивируемой популяции кератиноцитов. Стволовые клетки эпидермиса локализованы на базальной мембране и, следовательно, тесно взаимодействуют с входящими в ее состав белками (Spradling et al., 2001). В связи с этим представлялось перспективным для указанной цели применить метод селективной адгезии выделенных кератиноцитов к разным белкам внеклеточного матрикса (ВКМ) базальной мембраны, с которыми они взаимодействуют в неповрежденной коже. Для проверки данного предположения и разработки метода селективного разделения гетерогенной популяции клеток необходимо прежде всего выяснить, какие из белков базальной мембраны могут быть использованы для этой цели. Кроме того, важно установить степень взаимодействия с этими белками как свежесыведенной популяции кератиноцитов, так и после их культивирования.

Таким образом, четкое определение и идентификация стволовых клеток, обладающих высоким пролиферативным потенциалом, а также возможность получения из общей популяции эпидермальных клеток фракции стволовых кератиноцитов, представляет собой насущную задачу как для решения ряда фундаментальных вопросов, так и с точки зрения применения этих клеток в медицине с целью сокращения сроков заживления ран.

Цель и задачи работы

Целью данной работы являлось сравнительное исследование степени взаимодействия базальных клеток кожи с иммобилизованными белками внеклеточного матрикса для обогащения гетерогенной популяции кератиноцитов стволовыми клетками методом селективной адгезии.

Для достижения указанной цели было необходимо решить следующие основные задачи:

1. изучить степень взаимодействия кератиноцитов с разными белками внеклеточного матрикса и выявить из них наиболее адгезивные для недифференцированных клеток популяции;
2. сопоставить данные морфометрического анализа с окраской на существующие на сегодняшний день маркеры дифференцировки (p63, Ki67, K19);
3. получить поликлональные антитела на мембранные белки дифференцированных и недифференцированных кератиноцитов с целью выявления белков, специфичных для стволовых клеток эпидермиса.

Научная новизна работы

Впервые показано различное взаимодействие гетерогенной популяции кератиноцитов кожи человека с белками внеклеточного матрикса.

Выявлены белки внеклеточного матрикса, способствующие адгезии недифференцированных клеток эпидермиса.

Совмещение флуоресцентного окрашивания кератиноцитов на маркерные белки, отражающие степень дифференцировки, с морфометрическим анализом, проведенное в данной работе позволяет более четко выявлять недифференцированные клетки эпидермиса.

Получены поликлональные антитела на поверхностные белки дифференцированных и недифференцированных кератиноцитов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы могут быть использованы для решения фундаментальных вопросов, касающихся механизмов дифференцировки тканей, влияния белков внеклеточного матрикса на эти процессы, а также для создания клеточной линии стволовых клеток и более подробного их исследования.

Кроме того, выявление различных субпопуляций кератиноцитов может быть использовано, в том числе, и для решения вопросов заместительной терапии при создании клеточных продуктов.

Положения, выносимые на защиту

1. Белки внеклеточного матрикса различаются по степени взаимодействия с первичными кератиноцитами кожи человека, что выявляется при коротких сроках взаимодействия (до 30 мин).

2. Совмещение селективной адгезии с анализом распределения маркеров дифференцировки и морфометрических параметров субпопуляций кератиноцитов дает возможность проведения обогащения культивируемых кератиноцитов стволовыми клетками.

Апробация диссертации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 1 статья напечатана и 2 статьи приняты в печать. Материалы диссертации были представлены на Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина» (С-Петербург, 2005 г.), симпозиуме «Биология клетки в культуре» (С-Петербург, 2006 г.), II Съезде Общества клеточной биологии (С-Петербург, 2007 г.). Диссертационная работа апробирована на совместном научном семинаре Отдела клеточных культур, Лаборатории защитных механизмов клетки, Лаборатории радиационной цитологии, Лаборатории цитологии опухолевого роста и Межлабораторной группы биохимических основ репродукции клеток Института Цитологии РАН 24 октября 2007 г.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 216 наименований. Иллюстрационный материал содержит 35 рисунков и 3 таблиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки «ЛОТ-2005-ЖС-13.1/001», гранта Правительства Санкт-Петербурга для студентов и аспирантов 2006 г., гранта Президента Российской Федерации № НШ - 1244.2003.4 по поддержке ведущих научных школ, 2006-2007 г.г..

Материалы и методы

Выделение и культивирование кератиноцитов.

Первичную культуру кератиноцитов получали из кожи здоровых взрослых доноров по модифицированному методу Рейнвальда (Юдинцева и др., 1999; Rheinwald, 1980). В качестве источника эпидермальных клеток использовали фрагменты кожи, полученные при косметологических операциях. Выделенные клетки суспендировали в смеси сред DMEM/F12 (3:1, ICN, Франция). Выделенные кератиноциты культивировали в смеси сред DMEM/F12, с добавлением 10 % сыворотки, инсулина в концентрации 5 мкг/мл (Sigma, Франция), гидрокортизона 5 мкг/мл (Sigma, Франция), эпидермального фактора роста 10 нг/мл (Sigma, Франция), холерного токсина 10^{-10} М (ICN-Flow, США), трансферрина 5 мг/мл (Sigma,

Франция), аденина $1.8 \cdot 10^{-4}$ М (Sigma, Франция), лиотиронина $2 \cdot 10^{-11}$ М (Koch-Light, Великобритания). Клетки культивировали в течение 10-14 сут при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ (до образования многослойного пласта).

За сутки до опыта культуральную среду заменяли средой FAD (Биолот, Россия) с пониженным содержанием ионов Ca²⁺ (0.1 мМ) для того, чтобы произвести дестратификацию, то есть отслоение и удаление супрабазальных слоев дифференцированных клеток (Jensen, Volund, 1988). Клетки базального слоя обрабатывали 0.02 % раствором ЭДТА, затем смесью растворов 0.125 % трипсина и 0.02 % ЭДТА в соотношении 1:1 в течение 2–3 мин при 37 °С. Действие трипсина ингибировали добавлением культуральной среды. Полученные клетки центрифугировали (при 1000 об./мин, 5 мин), суспендировали в среде DMEM/F12, 3:1, и наносили на покровные стекла, предварительно покрытые белками ВКМ.

Взаимодействие клеток с белками внеклеточного матрикса.

В качестве субстратов для экспериментов по адгезии использовали белки ВКМ коллагены I и IV типов, ламинин 2/4 и фибронектин, а также матригель, являющийся комплексом белков внеклеточного матрикса и протеогликанов. Коллаген I типа был получен из сухожилий крысиных хвостов (Chandrakasan et al., 1967), коллаген IV типа – из плаценты человека (Kleinman, 1994). Коллагены были выделены и любезно предоставлены Л. В. Кухаревой, Институт Цитологии РАН, С-Петербург. Ламинин 2/4 был выделен из плаценты человека модифицированным методом Палма и Фурча (Palm, Furcht, 1983), фибронектин был получен из плазмы крови человека (Ruoslanti et al., 1982), матригель – из EHS саркомы мыши (Kibbey, 1994). Фибронектин, ламинин 2/4 и матригель любезно предоставлены И. В. Воронкиной (Институт цитологии РАН, С-Петербург). Растворы белков наносили на чашки Петри или на предварительно подготовленные покровные стекла и оставляли на ночь при 4 °С. Затем чашки и стекла трижды промывали раствором PBS. Для предотвращения неспецифического взаимодействия клеток с субстратом стекла дополнительно покрывали раствором 2% БСА (в течение 1 ч, при 37 °С) с последующей отмывкой PBS. На приготовленные субстраты наносили суспензию клеток в среде без сыворотки. В качестве контроля были использованы бычий сывороточный альбумин (БСА, Sigma, США) и полилизин-L (Sigma, США).

Схема селективной адгезии.

Свежевыделенные кератиноциты наносили на 10 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ на один из выбранных субстратов в среде DMEM/F12 (3:1) без добавления сыворотки. Не прикрепившиеся за это время клетки переносили в другую чашку с тем же субстратом и инкубировали в течение 20 мин. Затем не прикрепившиеся и за это время клетки

пересаживали на тот же субстрат на 30 мин и после этого срока не прикрепившиеся клетки удаляли. Клетки, прикрепившиеся (через 10, 20 и 30 мин) к субстрату, культивировали в течение 1 сут при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. В качестве контроля использовали те же кератиноциты, но без отбора по времени адгезии к соответствующему субстрату.

Определение числа прикрепившихся к субстрату кератиноцитов.

Подсчет числа клеток, прикрепившихся за определенный срок к субстрату, нанесенному на поверхность лунок, проводили с помощью метода иммуноферментного анализа (Kagecla et al., 1994). В этих экспериментах использовали 96-луночные платы (Nunc, США) для иммуноферментного анализа. В каждую лунку наносили 10 мкг субстрата и инкубировали при температуре 4 °С в течение ночи, затем лунки трижды промывали раствором PBS. Выделенные клетки промывали трижды смесью сред DMEM и F12 (3:1) без сыворотки с последующим их осаждением при 1000 g в течение 5 мин. Затем клетки суспендировали в среде без сыворотки и высевали в 96-луночные платы по 10⁵ клеток на лунку. После инкубации в течение определенного времени (в зависимости от конкретного эксперимента) неприкрепившиеся клетки удаляли, а прикрепившиеся фиксировали в течение 10 мин при 20°С 70 % раствором этилового спирта и окрашивали 0.1%-ым раствором генциан-виолета (в течение 20 мин). Краситель растворяли 10%-ой уксусной кислотой. Была построена калибровочная кривая, с помощью которой по величине оптической плотности растворов в лунках при длине волны 570 нм судили о количестве клеток, адгезировавших к данному субстрату. В отдельных случаях количество прикрепившихся клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева.

Получение и истощение иммуносывороток, содержащих поликлональные антитела на дифференцированные (ИС_д) и недифференцированные (ИС_б) клетки эпидермиса.

Для получения иммуносывороток на белки плазматических мембран кератиноцитов базального слоя (ИС_б) и дифференцированных клеток супрабазальных слоев (ИС_д), кератиноциты выделяли, культивировали до получения многослойного пласта и подвергали дестратификации, как это было описано ранее. Получение препаратов плазматических мембран кератиноцитов согласно методике Хеффнера (Haeffner et al., 1980), которыми иммунизировали кроликов, иммунизацию и получение иммуносывороток проводили в лаборатории цитологии опухолевого роста, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург. Полученные иммуносыворотки были подвергнуты перекрестному истощению. Качество истощения контролировали методом иммуноферментного анализа.

Имунофлуоресцентный анализ.

Содержание в клетках маркерных белков оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Клеточную суспензию наносили на покровные стекла с

иммобилизованными на них лигандами и инкубировали в течение необходимого времени при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Затем питательную среду удаляли, клетки фиксировали 4 % формальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре, инкубировали с 0.1%-ым раствором Тритона X-100 в течение 20 мин с последующей отмывкой PBS. Первые антитела наносили на 1 ч при комнатной температуре, после чего промывали PBS. В качестве первых антител были использованы:

- моноклональные мышинные антитела против кератинов человека: K5 в разведении 1:100, K10, 1:50, K14, 1:20 (Novocastra Laboratories Ltd, Великобритания), K19, 1:100, клон BA17 (Dako Cytomation, Дания); p63, 1:1000, клон 4A4 (Sigma, США); Ki67, 1:100 (BD Transduction LaboratoriesTM, США).

- иммуносыворотки, содержащие поликлональные кроличьи антитела, ISб или ISд в разведении 1:300.

Затем наносили вторые антитела на 30 мин с последующей отмывкой PBS. В качестве вторых антител были использованы: поликлональные кроличьи IgG против IgG мыши (Sigma, США), конъюгированные с FITC (Fluorescein Isothiocynate), в разведении 1:256; козьи антитела против Ig G кролика, конъюгированные с FITC, в разведении 1:60 (Sigma, США).

Актиновый цитоскелет выявляли окраской клеток родамин-фаллоидином. Для этого после обработки первыми и вторыми антителами родамин-фаллоидин добавляли на 15 мин с последующей отмывкой PBS. Препараты заключали в mounting medium и анализировали их с помощью флуоресцентного микроскопа «Karl Zeiss Axioscop» (Zeiss, Германия) или конфокального микроскопа Leica TCS SL (Zeiss, Германия). Зеленую флуоресценцию (FITC) возбуждали аргоновым лазером (488 нм), красную (родамин) – He-Ne лазером (543 нм). Флуоресценцию FITC (500-530 нм) и родамин-фаллоидина (580-630 нм) сканировали отдельно с помощью компьютерной программы Leica Confocal Software.

Анализ изображений клеток.

Измерение таких параметров, как площадь проекции клетки на подложку (A), ее периметра (P), а также значения усредненных интенсивностей флуоресценции клеток выполняли с помощью программы «WCIF ImageJ 1.37i» (National Institute of Health, Maryland, USA). О степени расплывания клеток судили по коэффициенту распластанности, Rp/Ra (Kuzminykh, Petrov, 2004; Petrov et al., 2007). Rp/Ra равен отношению радиусов, вычисленных по известным периметру и площади клеток. Для характеристики клеточной популяции был введен еще один коэффициент – G/R, отношение средних интенсивностей флуоресценции в клетке маркерного белка (кератина

19, p63, Ki67 или белков, с которыми связываются поликлональные антитела Isb или Isd) (G) и актина (R).

Аналитическую обработку полученных данных проводили на компьютере с помощью «Microsoft Excel 2003» и «Origin 6.1». Вычисление теоретических кривых распределения, значения которых с наибольшей вероятностью соответствуют экспериментальным значениям, выполняли, исходя из предположения, что вариации параметров носят случайный характер и имеют нормальное распределение. В качестве критерия отбора таких кривых для иллюстрации экспериментальных данных использовали величину коэффициента корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие свежевыделенных и культивируемых базальных кератиноцитов с разными белками внеклеточного матрикса

В процессе обновления эпидермиса кератиноциты последовательно изменяют степень дифференцировки при перемещении от базальной мембраны к поверхности кожи. В связи с этим можно предположить, что стволовые кератиноциты должны иметь большее сродство к белкам базальной мембраны, чем дифференцированные клетки. Для того чтобы проверить данное предположение и оценить степень взаимодействия разных клеток популяции кератиноцитов, выделенные из кожи клетки были посеяны на следующие белки ВКМ - коллагены I и IV типа, ламинин 2/4, фибронектин, а также матригель на одни сутки. После этого срока была подсчитана доля прикрепившихся клеток (рис.1).

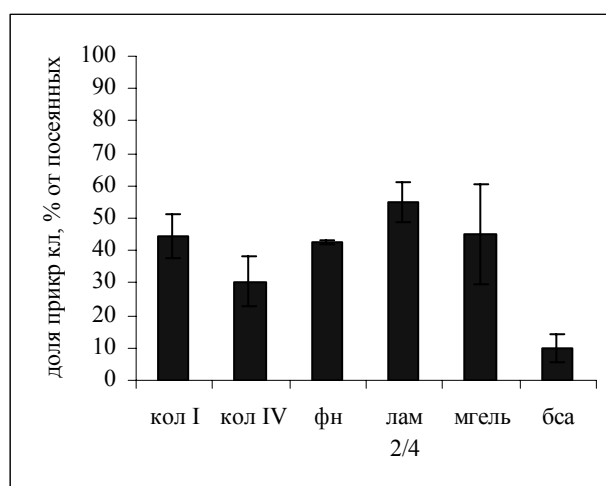


Рис. 1. Сравнение числа кератиноцитов, прикрепившихся к различным субстратам. Здесь и далее: кол I - коллаген I типа, кол IV - коллаген IV типа, фн - фибронектин, лам 2/4 - ламинин 2/4, мгель - матригель.

По сравнению с БСА, который не является для этих клеток естественным субстратом, и к которому прикрепляется только около 10% клеток, белки ВКМ, а также матригель, в большей мере способствовали адгезии клеток к подложке. К ним прикрепляется до 60% от исходного количества посеянных клеток. При сравнении субстратов между собой обнаружены относительно незначительные различия в количестве прикрепляющихся клеток. Отсутствие существенных различий в степени адгезии посеянных клеток могло происходить и в связи с секрецией собственных белков внеклеточного матрикса.

В связи с этим, для того чтобы выявить специфическое взаимодействие клеток с разными белками, время, отведенное для прикрепления клеток, было снижено. Оказалось, что при сроке адгезии, равном 30 мин, клетки предпочтительнее взаимодействуют с коллагенами I и IV типов и фибронектином (рис. 2, а). Естественно, что количество прикрепившихся кератиноцитов к данным субстратам было ниже и составляло 10-15 % от числа посеянных клеток. К ламинину 2/4 и матригелю за такое же время прикрепилось 5-7%. В качестве контроля была использована пластиковая поверхность культуральной чашки, необработанная белком (менее 1 % клеток).

Для того чтобы оценить долю недифференцированных клеток в популяции кератиноцитов, прикрепляющихся за 30 мин, было проведено выявление наличия в них маркеров дифференцировки путем окраски на различные кератины, соответствующие разным уровням дифференцировки. Кератины 5 и 14 (K5 и K14, соответственно) синтезируются недифференцированными клетками базального слоя, кератин 10 (K10) - более дифференцированными клетками супрабазальных слоев (Moll et al., 1982). При таком времени адгезии доля K5, K14- положительных клеток при взаимодействии с коллагенами или фибронектином составляла 80-90%, матригелем - 70%, ламинином 2/4 – 60% (рис. 2, б). В исходной суспензии первичных кератиноцитов доля K5-положительных клеток составляла около 60%, K10-положительных - примерно 40%. Таким образом, при снижении срока адгезии до 30 мин уже наблюдается отчетливое влияние нанесенных белков на состав клеток, прикрепляющихся к подложке. Кроме того, из всех исследуемых белков коллагены и фибронектин при данных условиях являются наиболее оптимальными для обогащения популяции недифференцированными клетками.

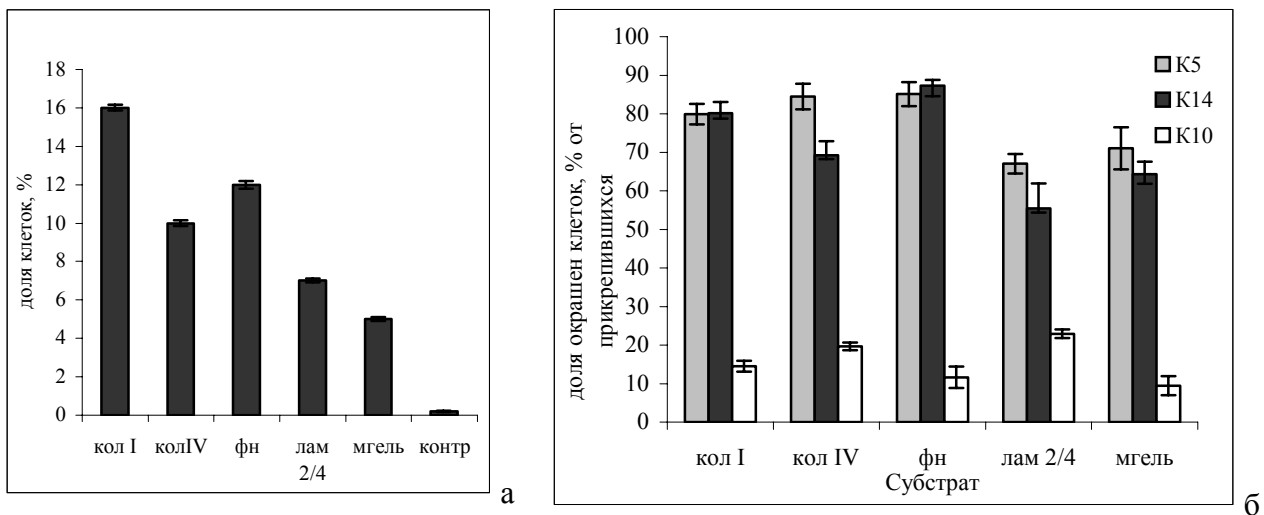


Рис. 2. а) Доля первичных кератиноцитов, адгезирующих за 30 мин, % от посеянных клеток. б) Соотношение K5 и K14-положительных и K10-положительных кератиноцитов среди клеток, прикрепляющихся за 30 мин.

Для того чтобы выяснить, как скажется на содержании недифференцированных клеток в популяции дальнейшее снижение времени адгезии, клетки были посеяны на 10 мин с последующим переносом неприкрепившихся клеток на тот же субстрат на 20 и затем на 30 мин. Наиболее значительное влияние на клеточную адгезию оказывают коллагены: количество клеток, прикрепляющихся к данным субстратам, приблизительно в 4-11 раз больше количества клеток, прикрепляющихся к БСА. Фибронектин и ламинин 2/4 усиливают адгезию примерно в 2-4 раза. Все исследуемые белки способствуют прикреплению большего количества клеток по сравнению с БСА. При этом с уменьшением времени до 10 мин увеличивается доля недифференцированных, то есть K5, K14 – положительных, клеток до 85-95%. Таким образом, данные эксперименты еще раз демонстрируют, что уменьшение срока адгезии (до 10 мин) способствует обогащению популяции недифференцированными клетками.

Для того чтобы выяснить, в какой степени длительное культивирование выделенных кератиноцитов влияет на их адгезивные свойства по сравнению с первичными кератиноцитами, клетки через 10-14 дней культивирования подвергали процедуре стриппинга и наносили на те же субстраты. По сравнению с первичными культивируемые кератиноциты не дают такой же картины зависимости адгезии от времени. При посеве культивируемых кератиноцитов на те же белки внеклеточного матрикса было выявлено, что за 10 мин прикрепляется примерно такое же количество клеток, как и за 1 ч (рис. 3). При этом к коллагенам и ламинину 2/4 прикрепляется 60-90% клеток от числа посеянных, тогда как к фибронектину максимум 50%.

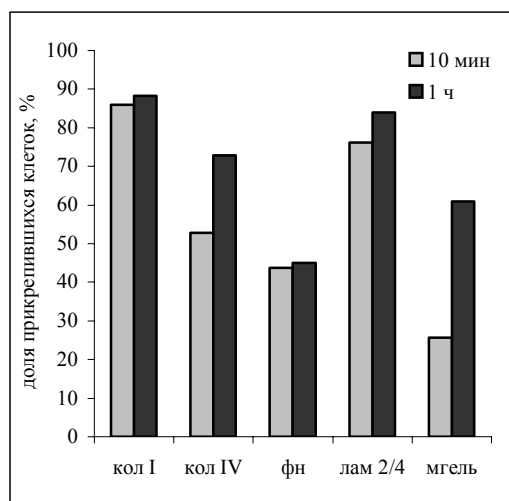


Рис. 3. Адгезия культивируемых кератиноцитов к белкам внеклеточного матрикса.

Было установлено также, что отселектированные по адгезии клетки растут медленнее, чем неотселектированные клетки общей популяции. Вероятно, это зависит от того, что быстро адгезирующие клетки имеют более медленный клеточный цикл, что подтверждается и литературными данными (Potten et al., 1982). Кроме того, этим клеткам, по-видимому, необходимо присутствие других клеток популяции, что еще раз говорит о существовании сложного состава «ниши стволовых клеток» эпидермиса.

Зависимость морфометрических параметров гетерогенной популяции кератиноцитов от времени адгезии к белкам внеклеточного матрикса

В связи с тем, что маркеры стволовых клеток эпидермиса не являются строго специфичными, как показали проведенные эксперименты, для того чтобы выявить разные субпопуляции клеток, необходимо привлечение дополнительных оценочных параметров. Из данных литературы следует, что недифференцированные прогениторные клетки кожи обладают круглой формой и характеризуются меньшими размерами (около 10 мкм) по сравнению с дифференцированными (Barrandon, Green, 1985; Webb et al., 2004). Известно, что взаимодействие клеток с субстратом, и в том числе степень сродства к нему, выражается степенью расплывания на нем клеток. На основании этих данных было выдвинуто предположение, что если клеткам дать достаточно времени для расплывания на субстрате, стволовые клетки, тем не менее, должны оставаться более мелкими и круглыми. Чтобы проверить данное предположение, было проведено исследование морфометрических параметров кератиноцитов.

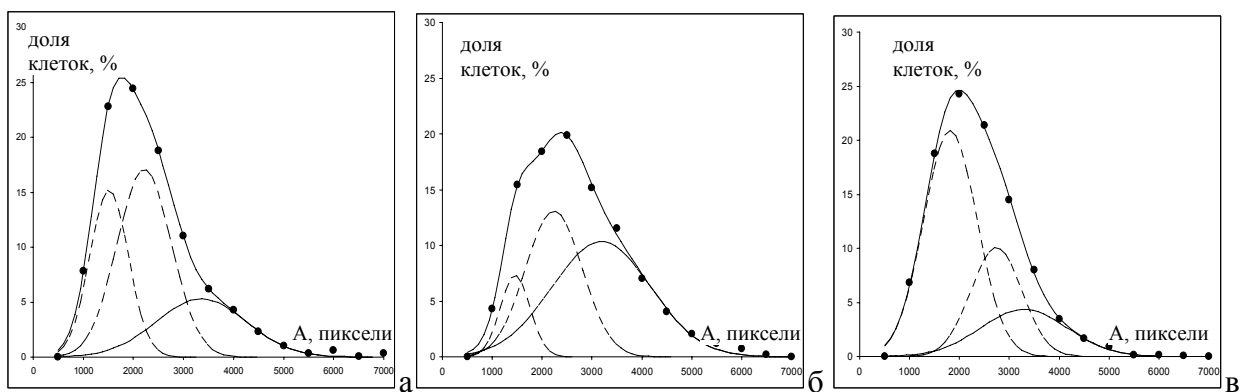


Рис. 4. Распределение клеток по величине A через 1 сут после посева. а - на фибронектине, б - коллагене I типа, в - коллагене IV типа. Точки – экспериментальные значения A . Сплошная линия – суммарная теоретическая кривая, полученная по опытным значениям, штриховые линии – кривые, отражающие распределение клеток по отдельным субпопуляциям.

Проведенный анализ показал, что в среднем площадь (A) клеток общей популяции, растущих в течение 1 сут на коллагене I типа, вдвое превосходит площадь тех же клеток, культивируемых на коллагене IV типа или на фибронектине. Это может быть связано с тем, что коллаген I типа в большей степени способствует дифференцировке клеток в культуре. Достоверных различий по данному параметру между клетками на фибронектине и коллагене IV типа не выявлено.

Гистограммы распределения клеток в зависимости от их площади, представленные на рис. 4, показывают, что в общей популяции кератиноцитов, посеянных на любой из исследуемых субстратов, достаточно сложно выявить некую субпопуляцию по такому параметру, как размер клеток.

При селекции кератиноцитов по скорости адгезии к отдельным белкам ВКМ субпопуляции выявляются более четко. Среди клеток, культивируемых на коллагенах, выявляются округлые мелкие клетки и клетки более крупные полигональной или вытянутой формы. Из агрегатов кератиноцитов, состоящих в основном из круглых клеток, начинают формироваться колонии, чего не наблюдается в случае с фибронектином, где клетки выглядят более однородными.

В целом на размер клеток, посеянных на фибронектин, практически не оказывает никакого влияние селекция клеток по времени прикрепления. На рис. 5-6 представлены данные по площади для клеток, отселектированных за 10, 20 и 30 мин.

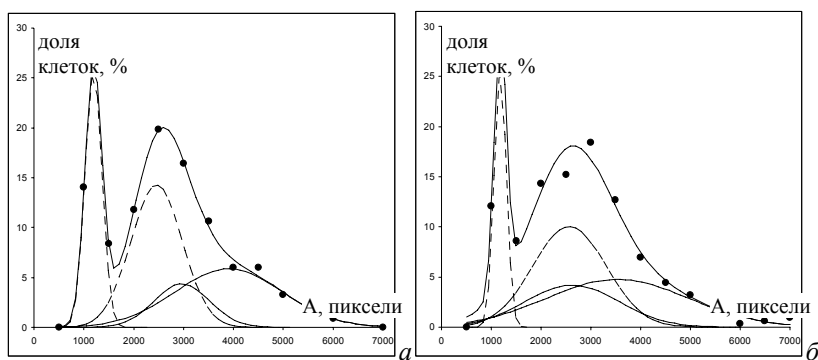


Рис. 5. Распределение клеток по величине A на коллагене I типа через 1 сут после посева. $a, б$ - клетки, отселектированные по адгезии в течение 20 и 30 мин соответственно. Здесь и на рис. 6: Точки – экспериментальные значения A . Сплошная линия – суммарная теоретическая кривая, полученная по опытным значениям, штриховые линии – кривые, отражающие распределение клеток по отдельным субпопуляциям.

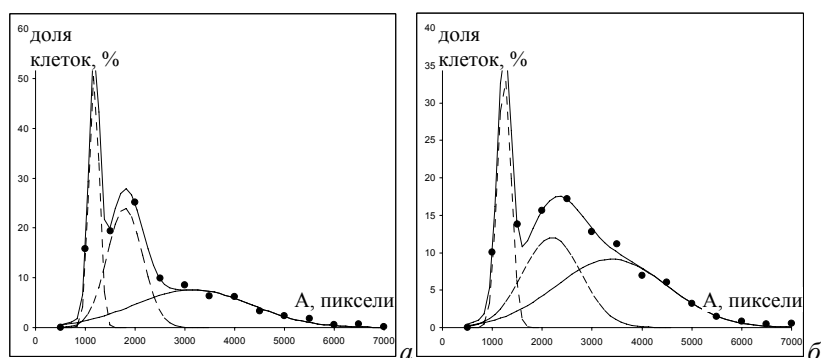


Рис. 6. Распределение клеток по величине A на коллагене IV типа через 1 сут после посева. $a, б$ - клетки, отселектированные по адгезии в течение 10 и 20 мин соответственно.

При селекции клеток, посаженных на фибронектин, не удастся выделить отчетливой субпопуляции. При использовании в качестве субстрата коллагена I типа четко выявляется субпопуляция клеток небольшого размера после адгезии в течение 20 мин и 30 мин. В случае коллагена IV типа аналогичная картина наблюдается при 10- и 20-минутном отборе.

Для сравнения был проведен анализ гетерогенности популяций длительно культивируемых кератиноцитов после пересева. В отличие от первичных кератиноцитов, несмотря на относительную гомогенность по размерам, среди популяции культивируемых кератиноцитов не удастся выявить отдельной субпопуляции клеток с малыми размерами, то есть, по-видимому, в культуре под воздействием окружающих факторов, стволовые клетки теряют свои свойства и переходят в состояние транзиторных.

То есть, среди первичных кератиноцитов в условиях 10-30 мин селекции, по-видимому, добавив еще один критерий, например, окраску на кератин 19 (K19), считающийся одним из более надежных маркером стволовых клеток эпидермиса, можно не только идентифицировать субпопуляцию небольших круглых клеток, которые, как предполагается, являются стволовыми клетками, но и выделить их в чистом виде.

Распределение маркеров стволовых клеток кожи (p63, Ki67, K19) в гетерогенной популяции кератиноцитов

Рассмотренных ранее параметров (скорости адгезии, длительности прохождения клеточного цикла, размера) недостаточно для точной идентификации покоящихся стволовых кератиноцитов. Известно, что эти клетки характеризуются повышенной экспрессией определенных белков, в том числе транскрипционного фактора p63 (Pellegrini et al., 2001), кератина 19 (Michel et al., 1996) и отсутствием в ядре белка, связанного с пролиферацией клеток, Ki67 (Gerdes et al., 1983). В связи с этим было решено проверить быстро адгезирующие кератиноциты на наличие данных белков и выявить, есть ли связь морфометрических параметров с одним из маркеров стволовых клеток, а именно K19.

Проведенные эксперименты показали, что при параллельном посеве первичных кератиноцитов на 10, 20, 30 мин доля клеток ярко окрашенных на p63 со временем снижается с 12-16% до 2-6% в зависимости от субстрата.

Примерно такую же долю среди быстро адгезирующих клеток составляют K19-положительные кератиноциты - 9-16 %. Их легко можно идентифицировать по яркой окраске (рис. 7). При анализе интенсивности флуоресценции кератина 19 (G) можно выделить 2 кластера (на рисунке они обведены в овалы). Через сутки ярко окрашенных клеток становится меньше, и интенсивность флуоресценции кератина в них снижается.

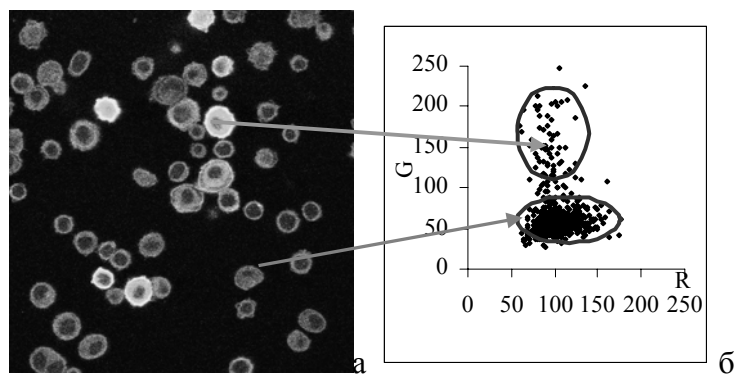


Рис. 7. а) Первичные кератиноциты, отселектированные за 10 мин, через 1 ч после посева, на коллагене I типа, окрашенные на актин и кератин 19. б) Взаимосвязь интенсивности флуоресценции кератина 19 (G) с интенсивностью флуоресценции актина (R). Каждая точка соответствует отдельной клетке с соответствующими значениями G и R.

Для того чтобы проверить, насколько совпадает распределение маркерных белков в клетках, монослой базальных кератиноцитов окрашивали на p63 и K19. Клетки с яркой окраской на p63 составляют около 90 % монослоя, тогда как окраска на кератин 19 не дает такой четкой картины. По-видимому, постепенная смена состава кератиновых филаментов в

процессе дифференцировки не позволяет в данных условиях провести четкую границу между окрашенными и неокрашенными клетками.

Белок Ki 67, являющийся косвенным отрицательным маркером стволовых кератиноцитов, был обнаружен в 6-10% базальных клеток, что совпадает с данными по p63.

Для количественной оценки гетерогенности популяции культивируемых кератиноцитах в зависимости от содержания в клетках кератина 19 был введен параметр G/R, отражающий соотношение средних интенсивностей флуоресценций кератина 19 и актина. Средняя интенсивность свечения пропорциональна средней концентрации данного белка в клетке.

У популяции кератиноцитов на фибронектине не обнаруживается корреляция между морфометрическими параметрами (A, P, Rp/Ra) и окраской клеток на кератин, которую отражает параметр G/R. Можно констатировать, что субпопуляции клеток с более низкими значениями G/R имеют достоверно больший размер при культивировании на коллагене I типа или на ламинине 2/4, при этом они имеют и большую степень распластности, чем клетки с относительно высокими значениями G/R (рис. 8).

На данных субстратах более мелкие клетки ярче окрашиваются на кератин, предположительно они являются прогениторными. И наоборот, крупные распластанные клетки характеризуются менее яркой окраской на K19 и, по-видимому, являются более дифференцированными. Из полученных данных следует, что в дальнейшем с помощью коллагена I типа и ламинина 2/4 будет возможно разделить популяции базальных кератиноцитов на субпопуляции с определенными морфометрическими характеристиками и окраской на кератин 19.

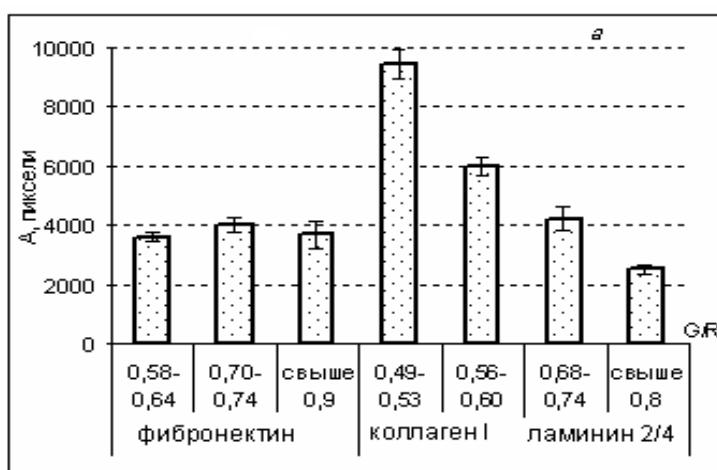


Рис. 8. Зависимость величины A от отношения G/R.

Получение кроличьих антител к дифференцированным и недифференцированным кератиноцитам

Поскольку различия в содержании всех известных маркеров, используемых для идентификации прогениторных клеток кожи, носят в основном количественный характер, а также в связи с отчетливым различием в адгезивных способностях разных субпопуляций кератиноцитов, была предпринята попытка, выявить такие поверхностные белки, которые были бы характерны для стволовых клеток и могли бы являться их специфическими маркерами. Из предыдущих результатов следует, что клетки с определенными параметрами специфично взаимодействуют с белками ВКМ, поэтому было сделано предположение, что у этих клеток есть специфические рецепторы к данным белкам. Для того чтобы проверить, существуют ли такие поверхностные мембранные белки, отличающие стволовые клетки от дифференцированных, были получены поликлональные антитела на мембранные белки дифференцированных и недифференцированных кератиноцитов, и сопоставлено окрашивание ими кератиноцитов с другими характеристиками клеток. Была получена сыворотка кролика, содержащая антитела к мембранным белкам а) кератиноцитов базального слоя (ИС_б) и б) дифференцированных кератиноцитов супрабазальных слоев (ИС_д). После перекрестного истощения, чтобы исключить взаимодействие антител и с одним, и с другим типом клеток, наличие соответствующих антител в сыворотке определяли с помощью иммуноферментного анализа.

При реакции базальных клеток с иммуносыворотками значимых отличий не наблюдается, что, по-видимому, говорит о неполном истощении ИС_д. Максимальная разница в реакции клеток дифференцированных клеток с этими же сыворотками при разведении антител 1/320 - в 4,5 раза. Показано, что полученные антитела могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров для идентификации недифференцированных клеток в популяции кератиноцитов, получаемой при выделении.

Выявление субпопуляций кератиноцитов, окрашиваемых полученными антителами ИС_б и ИС_д

Для того чтобы проверить специфичность взаимодействия полученных антител с клетками, были выбраны первичные кератиноциты, отсеleetированные путем адгезии к фибронектину в течение 10 мин. Было установлено, что антитела, полученные на недифференцированные кератиноциты (ИС_б), окрашивают клетки более мелкие, круглой формы (рис. 9, а) При сопоставлении окрашивания клеток антителами с данными морфометрического анализа выявлено, что величина параметра Р таких клеток около 150 пикселей. Доля кератиноцитов, ярко окрашивающихся ИС_б, в данной популяции составляла

около 40% (рис. 10, а). Тогда как антитела на дифференцированные кератиноциты (ИС_д) ярко окрашивают как клетки средних размеров, так и более крупные клетки, которые при данном сроке инкубации выглядят уже более вытянутыми и распластанными (рис. 9, б). Величина Р таких клеток от 100 до 300 пикселей, доля их в популяции около 60% (рис. 10, б). Таким образом, кератиноциты, ярко окрашивающиеся антителами ИС_д, и неокрашивающиеся ИС_б, являются дифференцированными.

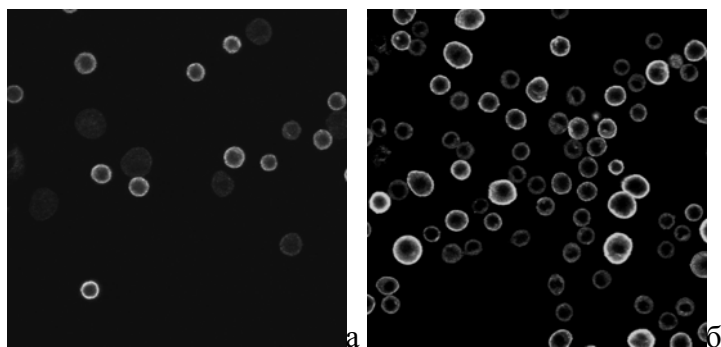


Рис. 9. Окраска первичных кератиноцитов, отселектированных за 10 мин, кроличьими поликлональными антителами полученными на мембранные белки а) базальных, б) дифференцированных кератиноцитов через 1 ч после посева.

Параллельно с антителами (ИС_б или ИС_д) кератиноциты окрашивали на актиновый цитоскелет, интенсивность флуоресценции которого для всех клеток исследуемой популяции составляла около 20 отн. ед. с незначительными отклонениями (рис. 10). То есть, субстрат при данном сроке инкубации еще не оказывает значительного влияния на состояние кератиноцитов и в том числе на их дифференцировку.

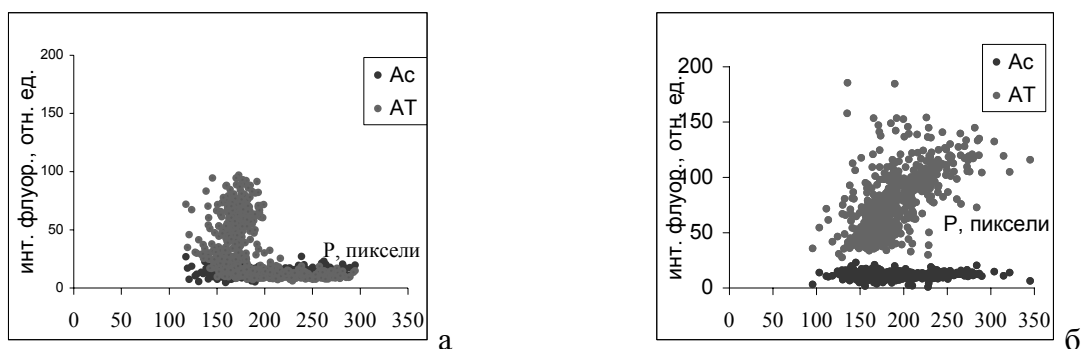


Рис. 10. Зависимость интенсивностей флуоресцентных окрасок а) ИС_б, б) ИС_д от параметра Р. Ас - интенсивность флуоресценции актина, АТ – интенсивность флуоресценции при окрашивании антителами (ИС_б или ИС_д).

Таким образом, полученные нами антитела позволяют четко выявлять две субпопуляции кератиноцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки, что в дальнейшем может быть использовано для разделения популяции кератиноцитов уже на этапе выделения их из кожи на дифференцированные и недифференцированные клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предположение о том, что стволовые клетки эпидермиса, лежащие на базальной мембране кожи, имеют высокое сродство к входящим в ее состав белкам, подтверждается сопоставлением взаимодействия с ними кератиноцитов, выделенных из кожи человека. При этом наибольшая специфичность взаимодействия выявляется на ранних сроках адгезии клеток к субстрату. Длительное культивирование (в течение 2 недель) нивелирует различия влияния разных субстратов на клетки, по-видимому, вследствие синтеза и секреции клетками собственных белков ВКМ. Вместе с тем, все проанализированные маркеры не позволяют выявлять отдельную субпопуляцию только стволовых клеток, а лишь клетки, находящиеся на разных стадиях подготовки к дифференцировке. Так как показано, что белки ВКМ предпочитают взаимодействовать с недифференцированными клетками эпидермиса, было сделано предположение, что среди поверхностных белков этих клеток есть такие, которые характерны только для стволовых кератиноцитов. В связи с этим были получены антитела на мембранные белки дифференцированных и недифференцированных кератиноцитов. Проведенные эксперименты показали, что окраска кератиноцитов данными антителами позволяет выявлять отдельные субпопуляции клеток. Кроме того, с помощью электрофореза было показано различие между составом белков мембран дифференцированных и недифференцированных клеток. Предполагается, что в дальнейшем это позволит получить моноклональные антитела на отдельные специфические белки для использования их в качестве маркеров стволовых клеток эпидермиса.

ВЫВОДЫ

1. Первичные кератиноциты кожи человека отличаются по способности к взаимодействию с различными белками внеклеточного матрикса. Наиболее адгезивными для них являются коллагены I и IV типов, а также фибронектин.
2. Недифференцированные кератиноциты, выявляемые окрашиванием антителами на кератины 5 и 14, обнаруживают наибольшую степень сродства к субстрату при коротких временах адгезии до 30 минут.
3. Совмещение морфометрического анализа прикрепившихся клеток к субстрату с окрашиванием на кератин 19, считающийся маркером стволовых клеток кожи, позволило выявить субпопуляцию мелких круглых клеток, предположительно представляющих собой субпопуляцию стволовых кератиноцитов.
4. Проведенные исследования с использованием таких маркеров стволовых клеток эпидермиса, как р63 и кератин 19, показали, что с их помощью возможно лишь выявлять и охарактеризовать группы клеток по наличию в них данных белков, однако они не могут являться строго специфичными только для стволовых клеток кожи в условиях *in vitro*.

5. С целью выявления маркерных белков, специфичных для стволовых клеток кожи, получены антитела на поверхностные белки кератиноцитов, которые выявляют более четкие различия между дифференцированными и недифференцированными клетками.

6. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что с помощью селективной адгезии с использованием специфических маркеров возможно проводить обогащение гетерогенной популяции кератиноцитов стволовыми клетками.

Публикации по теме диссертации

1. Спичкина О.Г. 2005. «Влияние белков внеклеточного матрикса на физиологическое состояние эпидермальных клеток кожи человека в культуре». Тезисы Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина», С-Петербург:114

2. Спичкина О.Г., Калмыкова Н.В., Воронкина И.В., Кухарева Л.В., Блинова М.И., Пинаев Г.П. 2005. «Выделение популяции базальных кератиноцитов путем их селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса». Тезисы конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты». Москва: 65-66.

3. Спичкина О.Г., Калмыкова Н.В., Блинова М.И., Пинаев Г.П. 2005. «Влияние белков внеклеточного матрикса на состояние кератиноцитов кожи человека в культуре». Тезисы VI Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток». Звенигород: 105

4. Спичкина О.Г., Калмыкова Н.В., Воронкина И.В., Кухарева Л.В., Блинова М.И., Пинаев Г.П. 2006. «Выделение популяции базальных кератиноцитов для использования их в аллогенных трансплантатах при лечении глубоких ожогов». Тезисы конференции «Актуальные проблемы ожоговой травмы». С.-Петербург. Скорая медицинская помощь. 3: 177-178.

5. Спичкина О.Г., Калмыкова Н.В., Воронкина И.В., Кухарева Л.В., Блинова М.И., Пинаев Г.П. 2006. «Идентификация р63-положительных клеток в популяциях базальных кератиноцитов человека, отселектированных путем адгезии на белках внеклеточного матрикса». Тезисы Всероссийского симпозиума «Биология клетки в культуре». С.-Петербург. Цитология. 48(9): 802.

6. Спичкина О.Г., Калмыкова Н.В., Воронкина И.В., Кухарева Л.В., Блинова М.И., Пинаев Г.П. «Выделение популяции базальных кератиноцитов человека путем их селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса». Цитология. 2006 г. 48(10): 841-845.

7. Спичкина О.Г., Блинова М.И., Пинаев Г.П. 2007. «Исследование гетерогенной популяции первичной культуры кератиноцитов кожи человека, культивируемых на разных

белках внеклеточного матрикса». Тезисы II Съезда Общества клеточной биологии. С.-Петербург. Цитология. 49(9): 795-796.

8. Спичкина О. Г., Пинаев Г. П., Петров Ю. П. «Анализ гетерогенности кератиноцитов человека, взаимодействующих с иммобилизованными фибронектином, коллагенами I и IV типа». Цитология. 2008. 50 (3): 210-217.

9. Спичкина О. Г., Пинаев Г. П., Петров Ю. П. «Сравнительный анализ гетерогенности популяции кератиноцитов человека по степени адгезии к субстрату и по соотношению содержания кератина 19 к актину». Цитология. 2008. 50(3): 218-227.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Хэм А., Кормак Д. 1983. Гистология. Т. 4, М., Мир.

Юдинцева Н. М., Горелик Ю. В., Дьяконов И. А., Калмыкова, Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 1999. Трансплантация аллогенных эпителиальных пластов на ожоговые раны. Цитология. 41 (3/4): 328.

Barrandon Y., Green H. 1985. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 82: 5390–5394.

Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251: 6062-6067.

Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int. J. Cancer. 31: 13-20.

Haeflner E.W., Kolbe K., Schroeter D., Paweletz N. 1980. Plasma membrane heterogeneity in ascites tumor cells. Isolation of a light and a heavy membrane fraction of the glycogen-free Ehrlich-Lettré substrain. Biochim Biophys Acta. 603(1): 36-51.

Jensen P., Bolund L. 1988. Low Ca²⁺ stripping of differentiating cell layers in human epidermal cultures: an in vitro model of epidermal regeneration. Exp. Cell Res. 175: 63-73.

Karecla P. L., Timpl R., Watt F. 1994. Adhesion of human epidermal keratinocytes to laminin. Cell Adhesion Commun. 2: 309-318.

Kibbey M.C. 1994. Maintenance of the EHS sarcoma and matrigel preparation. J. Tissue Culture Methods. 16: 227-230.

Kleinman H.K. 1994. Isolation of laminin-1 and type IV collagen from the EHS sarcoma. J. Tissue Culture Methods. 16: 231-233.

Kuzminykh E. V., Petrov Yu. P. 2004. A simple model for the study of effects of the extracellular matrix on the cell morphology in vitro. Biochem. biophys. acta. 1671: 18–25.

Lavker R.M., Sun T.-T. 1982. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science*. 215: 1239–1241.

Limat A., Klein C.E. 1993. Expression of epidermal integrins in human organotypic keratinocyte cultures. *Exp Dermatol*. 2(5): 196-203

Michel M., Török N., Godbout M.-J., Lussier M., Gaudreau P., Royal A., Germain L. 1996. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J. Cell Science*. 109: 1017–1028.

Moles J.-P., Watt F.M. 1997. The epidermal stem cell compartment: variation in expression levels of E-cadherin and catenins within the basal layer of human epidermis. *J. Histochem. Cytochem*. 45: 867-874.

Moll R., Frank W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 31(1): 11-24. Review.

Palm S.L., Furcht L.T. 1983. Production of laminin and fibronectin by Schwannoma cells: cell-protein interactions *in vitro* and protein localization in peripheral nerve *in vivo*. *J. Cell Biol*. 96: 1218-1226.

Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O., Martinelli E., Fantozzi I., Bondanza S., Ponzin D., McKeon F., De Luca M. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 3156-3161.

Petrov Yu. P., Krylova T. A., Tsupkina N. V., Pershina V.P. 2007. Spreading as the general attribute of cell population. *J. Biol. Sciences*. 7: 102–112.

Potten C.S., Wichmann H.E., Loeffler M., Dobek K., Major D. 1982. Evidence for discrete cell kinetic subpopulations in mouse epidermis based on mathematical analysis. *Cell Tissue Kinet*. 15(3): 305-329.

Rheinwald J.G. 1980. Serial cultivation of normal epidermal keratinocytes. *Meth. Cell Biol*. 21A: 229-254.

Romero M.R., Carroll J.M., Watt F.M. 1999. Analysis of cultured keratinocytes from a transgenic mouse model of psoriasis: effects of suprabasal integrin expression on keratinocyte adhesion, proliferation and terminal differentiation. *Exp. Dermatol*. 8: 53–67.

Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature*. 414: 98–104.

Webb A., Li A., Kaur P. 2004. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*. 72(8): 387-395.

Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M. D., Dotsch V., Andrews N. C., Caput D., McKeon F. 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell*. 2: 305–316.