

УДК 57.085.2:636.2

МЕХАНИЗМЫ РАСПЛАСТЫВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**Ковалева А.В., Творогова А.В., Саидова А.А.***ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий», Москва, e-mail: s.n.kovalchuk@mail.ru*

В настоящее время для регенерации поврежденных тканей все шире используются мезенхимальные стволовые клетки. Способность к прикреплению и распластыванию на субстрате является фундаментальным свойством клеток, влияющим на процессы развития, органогенеза и гомеостаза организма. Распластывание клеток происходит, когда клетки прикрепляются к адгезивному субстрату за счет выдвигания тонкой ламеллиподии. Мы проанализировали процесс распластывания мезенхимальных стволовых клеток, используя виртуальную синхронизацию начала распластывания. Распластывание мезенхимальных стволовых клеток крупного рогатого скота (МСК КРС) – это нелинейный процесс, который включает в себя быструю фазу (0–10 минут) и медленную фазу распластывания (30 минут – 3 часа). В первые десять минут клетки увеличивают свою площадь в 2–4 раза, а абсолютная начальная скорость распластывания уменьшается в 6,5 раз. Распластывание существенно замедляется при подавлении роста микротрубочек. В меньшей степени процесс распластывания замедляется при ингибировании полимеризации актина. При этом нарушение полимеризации микрофиламентов способствует изменению морфологии клеток. Таким образом, динамические микротрубочки являются основным регулятором распластывания мезенхимальных стволовых клеток крупного рогатого скота.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, актин, микротрубочки, распластывание**SPREADING MECHANISMS OF CATTLE MESHENYMAL STEM CELL****Kovaleva A.V., Tvorogova A.V., Saidova A.A.***Federal state budget scientific institution Center of experimental embryology and reproductive biotechnologies, Moscow, e-mail: s.n.kovalchuk@mail.ru*

Currently, mesenchymal stem cells are increasingly used for regeneration of damaged tissues. The ability to attach and spread on the substrate is a fundamental property of cells that affects the development, organogenesis and homeostasis of an organism. Spreading of cells occurs when cells attach to an adhesive substrate by protrusion of a thin lamellipodium. We analyzed the process of spreading mesenchymal stem cells using virtual synchronization of the start of spreading. Spreading of bovine mesenchymal stem cells (bovine MSCs) is a non-linear process that includes a fast phase (0-10 minutes) and a slow spreading phase (30 minutes – 3 hours). In the first ten minutes, the cells increase their area by 2–4 times, and the absolute initial spreading rate decreases by a factor of 6.5. Spreading of MSCs is important to slow down when microtubule growth is suppressed. Down the extent of the spreading process slows down when inhibiting actin polymerization. In this case, the perturbation of the polymerization of microfilaments promotes changes in cell morphology. Thus, dynamic microtubules are the main regulator of the spreading for bovine mesenchymal stem cells.

Keywords: mesenchymal stem cells, actin, microtubules, spreading

Способность к прикреплению и распластыванию на субстрате – фундаментальное свойство клеток, влияющее на процессы развития, органогенеза и гомеостаза организма. Нарушения этих процессов влияют на скорость регенерации поврежденных тканей, иммунного ответа организма, а кроме того могут быть причиной развития опухолей [1].

В ранних работах показано, что процесс распластывания клеток на субстрате имеет линейную динамику [2], что может быть объяснено асинхронностью начала распластывания в разных клетках и гетерогенностью популяции по стадиям распластывания. Синхронизация клеток по началу распластывания позволила выявить нелинейность этого процесса. В нем выделяют 3 фазы: прикрепления (P0), быстрого распластывания (P1) и медленного

распластывания с дальнейшей поляризацией (P2) [3]. Первая фаза распластывания достаточно короткая, её продолжительность составляет всего несколько минут и зависит от степени адгезивности субстрата и присутствия сыворотки в среде культивирования [4]. Вторая стадия также непродолжительна, характеризуется быстрым ростом площади клетки за счет образования значительных по размерам протрузий и незначительных ретракций [5]. Третья стадия является самой продолжительной и характеризуется медленным ростом средней площади клетки, ее периодическими значительными сокращениями, а также образованием стабильных клеточных адгезий.

Распластывание клеток на субстрате начинается с выдвигания коротких плоских выростов плазматической мембраны – ла-

меллиподий – и зависит от скорости полимеризации актина на краю клетки [6]. Быстро увеличив свою площадь на первых стадиях распластывания, клетка поляризуется за счет формирования актомиозиновых комплексов и их сокращения [7]. Таким образом, роль актина и актомиозиновых комплексов на ранних этапах распластывания является ведущей и подтверждается в опытах с использованием их селективных ингибиторов. Латранкулин А, связываясь с мономерным актином, предотвращает его полимеризацию. Разрушение пучков актина с помощью цитохалазина D или латранкулина В приводит к потере способности клетки к поляризации, движению и перероентации при изменении направления растяжения субстрата [8].

Микротрубочки также играют существенную роль в распластывании, поляризации и последующем движении клеток. Так, растущие микротрубочки на краю клеток стимулируют формирование ламеллиподий [9]. Деполимеризация микротрубочек в распластаных и распластывающихся клетках приводит к усилению актомиозинового сокращения [10] и гипертрофии стресс-фибрилл в клетках. К таким же последствиям приводит не только полная разборка микротрубочек, но и подавление их динамической нестабильности [11]. Динамические микротрубочки в движущихся клетках стимулируют разборку фокальных контактов [12], подавляя актомиозиновое сокращение. Таким образом, различные элементы цитоскелета обеспечивают прикрепление, распластывание и передвижение клеток по субстрату, а динамика этих процессов определяется взаимодействием системы микротрубочек и актиновых филаментов.

В настоящее время для регенерации поврежденных тканей все шире используются мезенхимальные стволовые клетки. Их культивирование и дифференцировка проводятся *in vitro*. Известно также, что при ряде патологических состояний наблюдаются повреждения цитоскелета и его функциональные нарушения в клетках. В связи с этим важно определить динамические свойства разных компонентов цитоскелета в распространенной *in vitro* модели культивирования нормальных мезенхимальных стволовых клеток КРС для разработки экспериментальных и клинических моделей заболеваний, связанных с патологиями цитоскелета.

Цель исследования: анализ процесса прикрепления и распластывания мезенхимальных стволовых клеток КРС в нормальных условиях и в условиях нарушений

цитоскелета под действием селективных ингибиторов.

Материалы и методы исследования

Культура клеток

Мезенхимальные стволовые клетки крупного рогатого скота (МСК КРС) 5–7 пассажей (получены из банка Центра экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, Москва, Россия) культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂, в среде DMEM/F12(1:1) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (ПанЭко, Россия), гентамицина в концентрации 0,09 мг/мл, 2,5 мкг/мл амфотерицина В и 2 мМ глутамин. Для детального анализа распластывания полученную при помощи раствора трипсин-ЭДТА (ПанЭко, Россия) суспензию клеток помещали в чашки Петри. Концентрацию клеток подбирали таким образом, чтобы в ходе распластывания соседние клетки не контактировали. Прижизненные наблюдения вели при помощи системы Nikon BioStation IM-Q, изображения записывались с интервалом 1 минута в течение 3,5 часов.

Ингибиторы

Для деполимеризации микротрубочек (MT) использовали нокодазол (Sigma-Aldrich, USA) в концентрации 1 мкМ. Для стабилизации MT использовали 1 мкМ паклитаксела (таксол) (Sigma-Aldrich, USA). Для ингибирования полимеризации актина клетки инкубировали с 30 нМ цитохалазином D (Sigma-Aldrich, США) или 200 нМ латранкулином B (Sigma-Aldrich, США). Ингибитором Rho-ассоциированной киназы (ROCK) являлся 10 мкМ Y-27632 (Sigma-Aldrich, США).

Флуоресцентная микроскопия

Клетки фиксировали 2.5% раствором глutarового альдегида на PBS (pH = 7,2) при +4 °С в течение 20 минут, трижды отмывали PBS и проводили пермеабиллизацию клеток смесью 0,01% Triton-X114 и 0.01% Tween-20 на PBS в течение 60 минут при комнатной температуре. После трехкратной отмывки буфером клетки обрабатывали 1% раствором боргидрида натрия. Затем клетки окрашивали первыми антителами к α -тубулину (клон DM1A, Invitrogen, США) в соотношении 1:150 при температуре 37 °С 60 минут и вторыми антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Cy-2 (Invitrogen, США). Затем клетки окрашивали с помощью ActinReadyProbes 555 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) 30 минут при комнатной температуре, для контрастирования ядер использовали флуоресцентный краситель DAPI (разведение 1:500, окрашивание в течение 10 минут при комнатной температуре). Препараты заключали в мовиол и производили съемку на инвертированном флуоресцентном микроскопе NikonEclipseTI (Nikon, Япония) с помощью фазовоконтрастного объектива планапохромат 60x/1.4 (Nikon, Япония), используя кубики светофильтров для FITC, DAPI и Texas Red. Изображения записывались на компьютер с помощью охлаждаемой КМОП камеры ORCAFlash 4.2 (Hamamatsu, Япония), управляемой программой MicroManager.

Анализ данных

Обработку и анализ полученных фильмов производили в программе ImageJ (NIH Image, США).

Скорость распластывания рассчитывали как скорость увеличения площади клеток в единицу времени. Статистический анализ производили в программе SigmaPlot 3.0 (Jandel Scientific, США). Окончательную обработку изображений проводили в программе Photoshop CS (Adobe Inc., США).

Результаты исследования и их обсуждение

Распластывание – это нелинейный процесс

Для описания поведения МСК КРС при распластывании были построены кривые кинетики распластывания. Распластывание клеток на субстрате может идти двумя путями: изотропно и анизотропно. Изотропное распластывание характеризуется быстрым образованием симметричной кольцевой ламеллы, тогда как при анизотропном распластывании происходит одновременное формирование нескольких ламелл, и весь процесс идет медленнее. Для большинства МСК КРС характерно анизотропное распластывание, в некоторых клетках распластывание было изотропным.

Кинетика распластывания МСК может быть описана в виде сигмовидной кривой. Начальная скорость распластывания была максимальной в первые 10 минут (фаза P1) (рис. 1, табл. 1). Дальнейшее распластывание (фаза P2) проходило медленнее, и в конце первого часа общая площадь кле-

ток увеличилась в $6,21 \pm 0,82$ раз по сравнению с начальными значениями (табл. 2). Далее, скорость распластывания продолжала снижаться, в то время как некоторые клетки частично поджимались. Площадь клеток к концу третьего часа увеличилась в $10,16 \pm 1,62$ раз относительно начальной площади (рис. 2).

Распластывание сопровождалось изменениями морфологии клеток. В момент прикрепления круглые клетки имели ровный контур (рис. 3), к третьему часу края клеток становились изрезанными. После детального анализа кинетики и морфологии распластывания МСК мы перешли к описанию цитоскелета. Для анализа роли МТ мы использовали 3 воздействия: полную деполимеризацию МТ в высокой концентрации нокодазола (1 мкМ), полную стабилизацию МТ в высокой концентрации паклитаксела (1 мкМ) и подавление динамической нестабильности МТ сочетанием наномолярных доз нокодазола и паклитаксела. Для анализа роли актина в распластывании МСК мы использовали ингибиторы полимеризации актина (30 нМ цитохалазин Д и 200 нМ латрункулин Б). Для анализа роли миозина II мы ингибировали миозин II-фосфорилирующую киназу ROCK специфическим ингибитором Y-27632 в концентрации 10 мкМ.

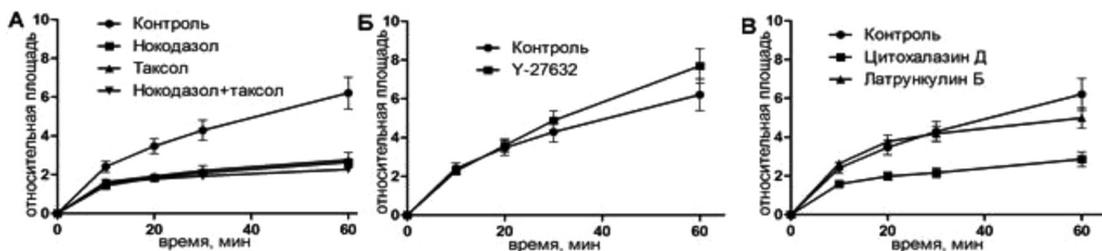


Рис. 1. Кинетика распластывания МСК КРС в контроле и при воздействии ингибиторов цитоскелета в интервале 0–60 минут

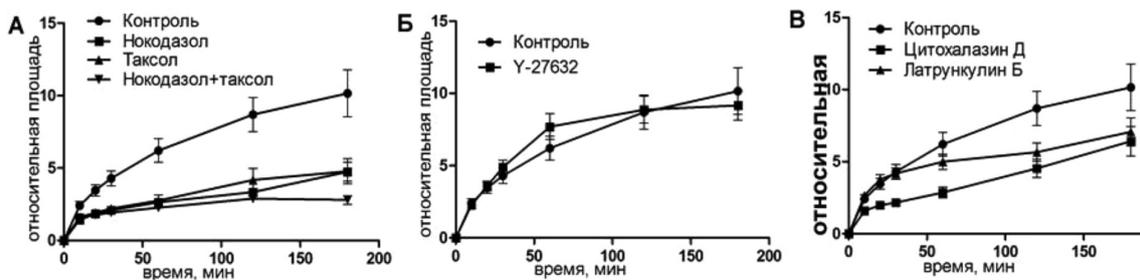


Рис. 2. Кинетика распластывания МСК КРС в контроле и при воздействии ингибиторов цитоскелета в интервале 0–180 минут

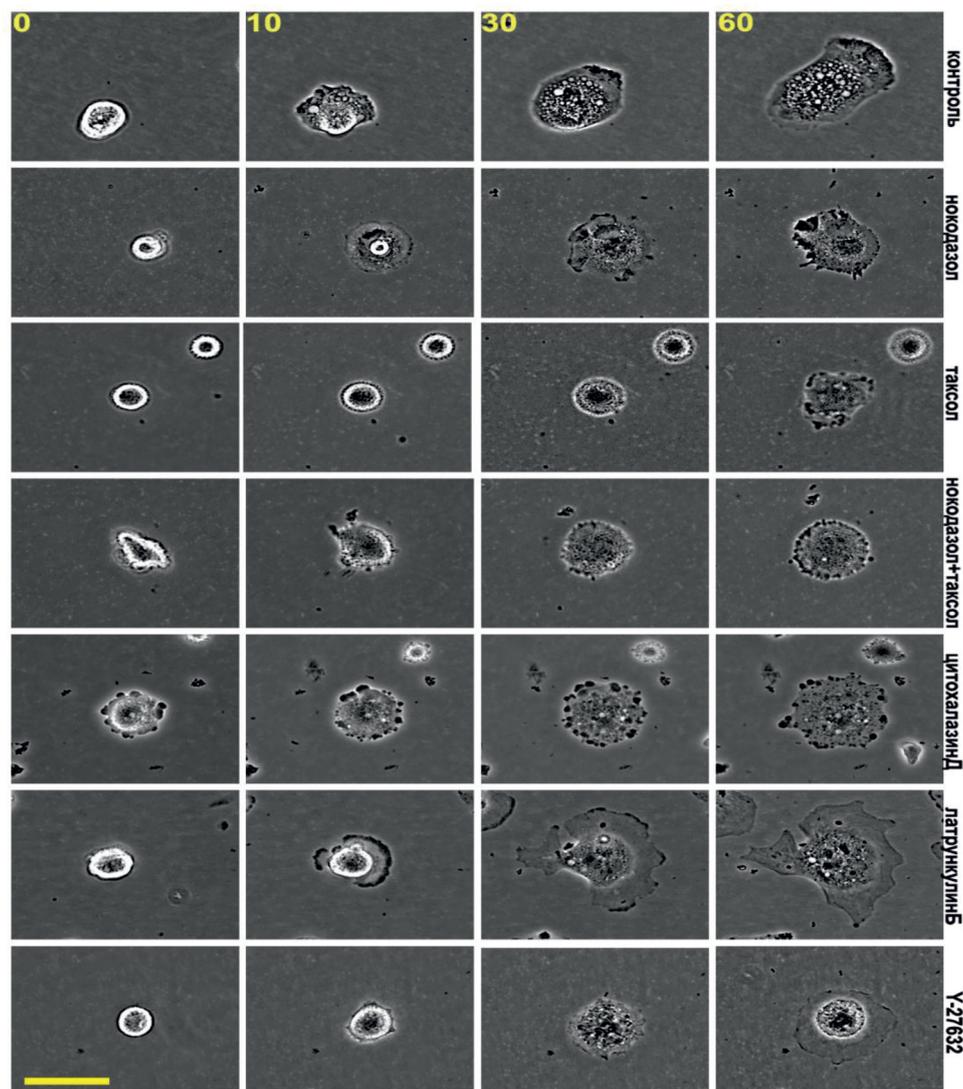


Рис. 3. Распластывание мезенхимальных стволовых клеток в норме и в присутствии ингибиторов цитоскелета. Масштабный отрезок – 10 мкм

Распластывание МСК при деполимеризации МТ

Клетки с деполимеризованными МТ были круглыми, распастывание сопровождалось активным блеббингом. Некоторые клетки так и не начали распастываться в течение всего времени (3,5 ч). Распастывание начиналось с образования небольших псевдоподий, которые сплющивались при прикреплении, а затем образовывали небольшие пластинки. Блеббинг не прекращался после образования ламеллы и продолжался в течение 1–3 ч (рис. 3). Процесс распастывания клеток с разрушенными МТ всегда был анизотропным и мог быть описан линейной зависимостью (рис. 2). Распастывание клеток проходило медленнее относительно контроля. К концу

первого часа площадь клеток увеличилась в $2,64 \pm 0,19$ раз, а к концу третьего часа в $4,74 \pm 0,65$. Кроме того, площадь клеток под воздействием нокодазола была меньше в любой временной точке относительно контроля (табл. 2).

Таким образом, полная деполимеризация МТ приводит к возникновению блеббинга, который сопровождается выдвиганием ламеллы, замедлению распастывания и отсутствию клеток с широкими ламеллами и к исчезновению быстрой фазы распастывания. Поскольку многие эффекты, связанные с отсутствием МТ, могут происходить и в случае стабилизации МТ, мы дополнительно оценивали поведение клеток после стабилизации МТ высокими дозами паклитаксела.

Таблица 1

Скорость распластывания МСК КРС

Скорость (мкм ² /мин)	Временной интервал, мин					
	0–10	10–20	20–30	30–60	60–120	120–180
Контроль	181 ± 24	137 ± 21	105 ± 27	82 ± 18	51 ± 16	28 ± 18
ЦитохалазинД	111 ± 19	78 ± 17	34 ± 9	45 ± 9	54 ± 10	56 ± 16
ЛатрункулинБ	242 ± 24	165 ± 26	60 ± 21	39 ± 12	17 ± 5	7 ± 9
У-27632	190 ± 20	199 ± 27	194 ± 29	141 ± 26	29 ± 4	11 ± 5
Нокодазол	56 ± 7	41 ± 9	32 ± 5	23 ± 3	15 ± 3	30 ± 10
Таксол	87 ± 13	42 ± 9	40 ± 9	25 ± 7	33 ± 12	14 ± 5
Нокодазол + таксол	96 ± 17	33 ± 6	26 ± 5	18 ± 3	17 ± 4	3 ± 3

Распластывание МСК в условиях стабилизации МТ

При полной стабилизации МТ блеббинг начинается еще до момента прикрепления клеток и продолжается в течение всех 3,5 часов наблюдения (рис. 3). Клетки начинают распластываться изотропно, но кривая распластывания описывается линейной зависимостью (рис. 2). Через 60 минут площадь клеток увеличивается в $2,76 \pm 0,39$ раз. К концу третьего часа площадь клеток увеличивается в $4,78 \pm 0,86$ раз относительно площади в момент прикрепления. Площадь клеток под воздействием паклитаксела всегда ниже, чем в контроле (табл. 2). Скорость распластывания клеток со стабильными МТ всегда ниже, чем в контроле, однако статистически достоверно отличаются скорости только в течение первого часа распластывания (табл. 1).

Таким образом, полная стабилизация МТ приводит к возникновению блеббинга, который сопровождает распластывание в течение всего времени наблюдения, значительному замедлению процесса распластывания и уменьшению площади клеток.

Поскольку выдвигание ламеллы главным образом связано с работой актомиозинового комплекса, далее мы проанализировали процесс распластывания мезенхимальных стволовых клеток при нарушении активации миозина II и при ингибировании полимеризации актина наномолярными дозами цитохалазина Д и латрункулина Б.

Распластывание в условиях подавления миозин II-зависимого каскада

В присутствии У-27632 клетки демонстрировали нормальную кинетику распластывания в течение всего времени наблюдения. Распластывание происходило за счет формирования протрузий в нескольких направлениях, поэтому ламелла была изрезанной и рассеченной, а клетки к 3 часу приобретали звездчатую форму с многочис-

ленными выступами, которые продолжали удлиняться.

Кинетика распластывания для всех трех фаз: P0, P1 и P2 – была почти одинаковой для клеток в присутствии У-27632 и контрольных клеток во все моменты времени (рис. 2). Под воздействием ингибитора края клеток становились более изрезанными (через 3 ч значение округлости составляло $0,55 \pm 0,05$).

Таким образом, при ингибировании миозина II происходят значительные изменения в морфологии клеток. В связи с тем, что кинетика распластывания под воздействием У-27632 не изменяется, мы дополнительно оценивали поведение клеток при подавлении полимеризации актина цитохалазином Д и латрункулином Б в наномолярных концентрациях.

Процесс распластывания при нарушении полимеризации актина

Под воздействием цитохалазина Д распластывание сопровождается активным блеббингом, который начинается до прикрепления клеток к субстрату и продолжается в течение всего времени наблюдения. В момент прикрепления клетки имеют круглую форму, но к концу первого часа клетки имеют несколько зон активности (рис. 3). Кинетика распластывания описывается нелинейно, клетки распластывались с максимальной скоростью в первые 10 минут (рис. 1, табл. 1). К концу первого часа площадь клеток увеличилась в $2,86 \pm 0,37$ раз. Через 3 часа площадь клеток увеличилась в $6,42 \pm 1,03$ раза относительно начального значения.

Под воздействием латрункулина Б блеббинг появлялся с момента прикрепления, но к концу первого часа пузырей становилось меньше. Распластывание шло анизотропно за счет образования нескольких ламелл. Через 20 минут клетки имели значительно более изрезанный контур по сравнению с контролем, за счет образования вогнутых участков (округлость $0,74 \pm 0,03$). В ходе дальнейшего распластывания вогнутые

участки были стабильными, а ламелла продолжала выдвигаться, что способствовало увеличению изрезанности ламеллы (округлость к концу первого часа – $0,64 \pm 0,04$) (рис. 3). Таким образом, ингибирование полимеризации актина цитохалазином Д замедляет процесс распластывания и изменяет морфологию клеток. Ингибирование полимеризации актина латрункулином Б значительно влияет на морфологию клеток

и замедляет распластывание клеток в часовом интервале.

Морфология систем цитоскелета в контрольных клетках

В контрольных клетках уже через 10 минут после прикрепления начинают полимеризоваться МТ (рис. 4). Актин тонкой полосой окаймляет клеточную ламеллу, а также распределен по всей цитоплазме (рис. 4).

Таблица 2

Изменение площади МСК КРС в процессе распластывания

Площадь, мкм ²	Временная точка, мин						
	0	10	20	30	60	120	180
Контроль	524 ± 73	1263 ± 151	1820 ± 204	2250 ± 269	3259 ± 430	4565 ± 620	5329 ± 851
Цитохалазин Д	788 ± 79	1243 ± 110	1563 ± 164	1701 ± 194	2253 ± 290	3571 ± 499	5058 ± 808
Латрункулин Б	599 ± 41	1583 ± 113	2256 ± 204	2501 ± 225	2986 ± 317	3387 ± 389	4236 ± 578
У-27632	611 ± 52	1384 ± 107	2193 ± 205	2984 ± 308	4705 ± 544	5417 ± 569	5602 ± 625
Нокодазол	529 ± 37	759 ± 53	971 ± 69	1104 ± 80	1396 ± 101	1765 ± 151	2507 ± 345
Таксол	572 ± 44	926 ± 83	1100 ± 109	1263 ± 145	1576 ± 220	2389 ± 452	2734 ± 489
Нокодазол + таксол	686 ± 65	1079 ± 116	1215 ± 112	1323 ± 117	1554 ± 127	1982 ± 192	1930 ± 202

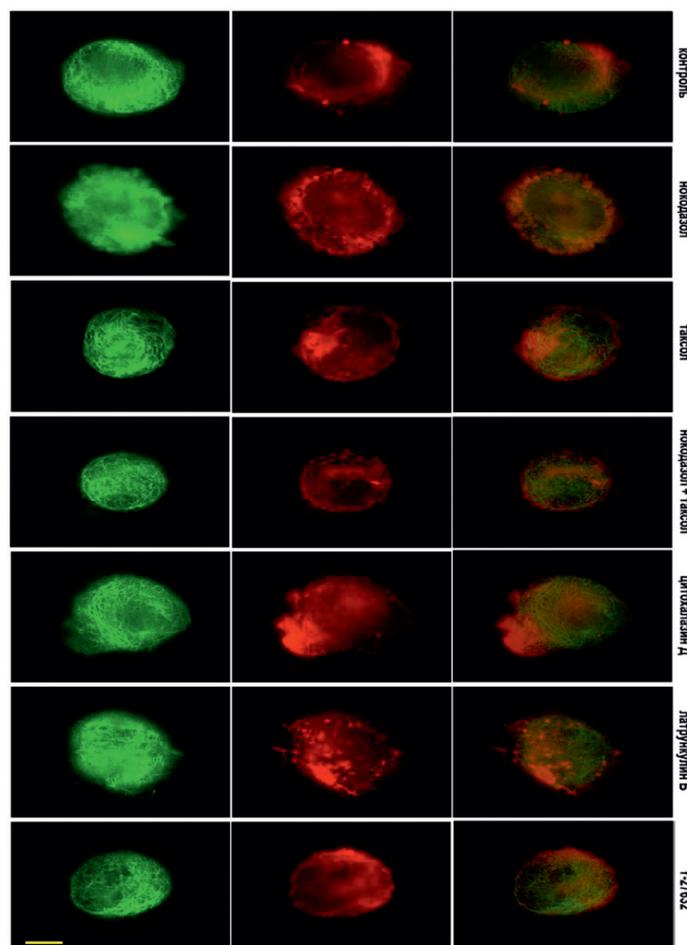


Рис. 4. Микротрубочки (зеленые) и актин (красный) через 10 мин после прикрепления клеток к субстрату в норме и при ингибировании цитоскелета. Масштабный отрезок – 10 мкм

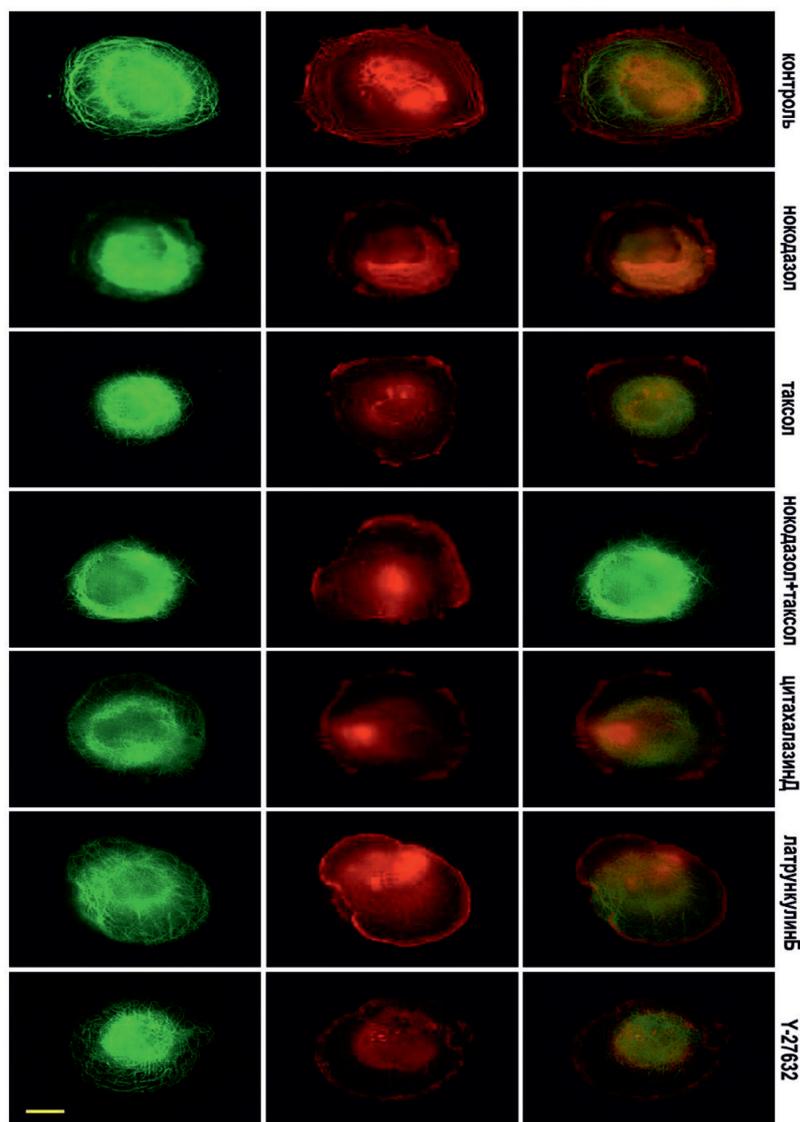


Рис. 5. Микротрубочки (зеленые) и актин (красный) через 30 мин после прикрепления клеток к субстрату (стекло) в норме и при ингибировании цитоскелета. Масштабный отрезок – 10 мкм

Через 30 минут в клетках формируется густая радиальная сеть микротрубочек, но большинство растут дугообразно, замыкаясь в кольцевую структуру, которая не достигает до края клеток (рис. 5).

В это же время начинает полимеризоваться актин, и по периферии клетки располагаются короткие радиально направленные пучки актиновых микрофиламентов. Через 60 минут после начала распластывания МТ образуют густую сеть, большинство МТ направлены перпендикулярно краю клетки (рис. 6). Также в клетке формируются актиновые стресс-фибриллы, которые располагаются по всей цитоплазме, а кроме того, актин распределен по самому краю клетки, образуя окаймление (рис. 6).

Цитоскелет в условиях деполимеризации МТ

Под воздействием высоких доз нокодазола МТ в клетках отсутствуют на всех стадиях распластывания (рис. 4–6). При полной разборке микротрубочек в клетках наблюдается блеббинг, актин сосредоточен в пузырьках и окаймляет их (рис. 4). Через 30 минут после посадки актин также находится в блебсах, а актин распределен по цитоплазме. В отличие от контрольных клеток, стресс-фибриллы на данном этапе распластывания отсутствуют (рис. 5). Через 60 минут после посадки крупные актиновые стресс-фибриллы располагаются циркулярно, а небольшие пучки актина распределены по всей цитоплазме.

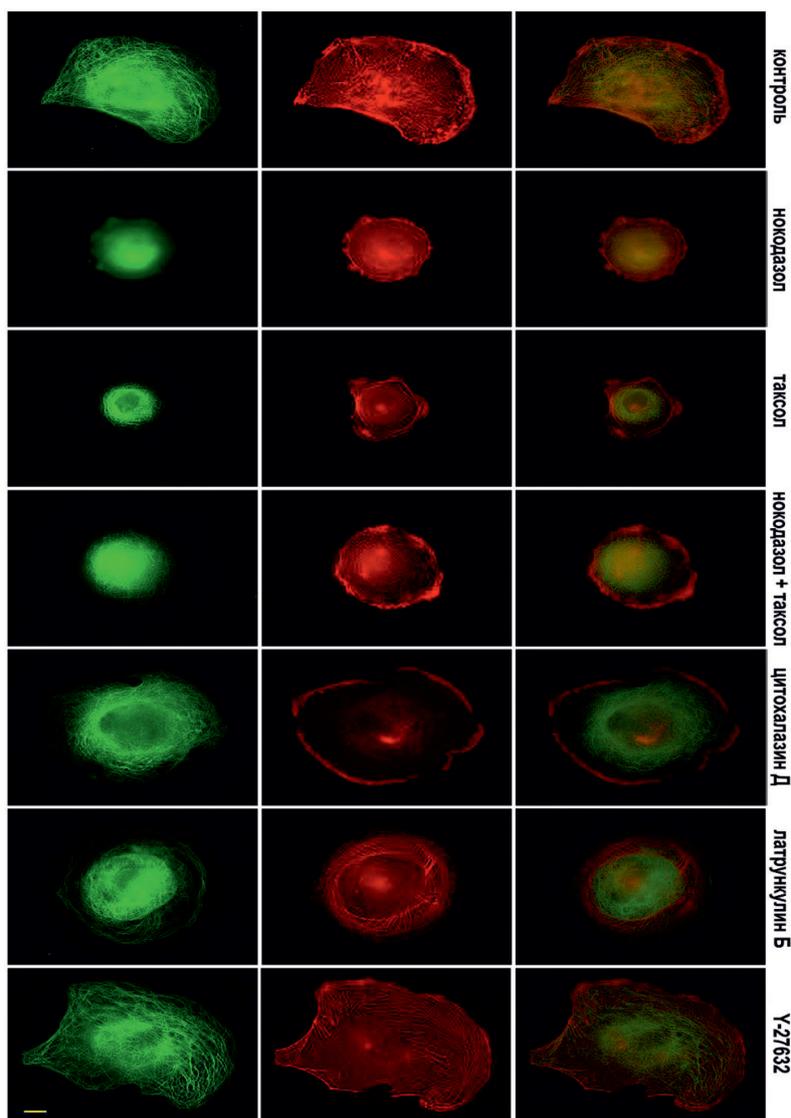


Рис. 6. Микротрубочки (зеленые) и актин (красный) через 60 мин после прикрепления клеток к субстрату в норме и при ингибировании цитоскелета. Масштабный отрезок – 10 мкм

В условиях полной деполимеризации МТ содержание полимерного актина (собранный в стресс-фибриллы и в пучки) меньше, по сравнению с контролем (рис. 6).

Цитоскелет при полной стабилизации МТ

Под воздействием паклитаксела в высокой концентрации МТ образуют более редкую сеть в любой момент распластывания. Кроме того, по сравнению с контрольными клетками, МТ сильно не дорастают до края клетки (рис. 4–6). Актин, через 10 мин после посадки, располагается преимущественно в пузырьках (рис. 4). Через 30 мин после начала распластывания актин сосредоточен на периферии клетки, а также выявляются скопления актина в цитоплазме. Стресс-

фибриллы в отличие от контрольных клеток отсутствуют (рис. 5). Через 60 мин после начала распластывания, в клетках с полностью стабилизированными МТ формируются полигональные актиновые стресс-фибриллы (рис. 6).

Цитоскелет при ингибировании полимеризации актина

Под воздействием цитохалазина Д актин сконцентрирован в пузырьках клеток, распластывание которых сопровождается активным блеббингом (рис. 4–6). Система МТ на раннем этапе распластывания (через 10 мин после посадки) такая же как и контроле. При этом во время блеббинга микротрубочки вырастают в пузырьки (рис. 4). Через

30 минут после посадки сеть МТ более редкая, чем в контроле. Актин сконцентрирован по клеточной периферии и рассеян по цитоплазме.

Цитоскелет в условиях подавления миозин II-зависимого каскада

При ингибировании ROCK через 10 мин после начала распластывания МТ выглядят также как и контроле. Актин сконцентрирован в блебсах клеток (рис. 4). Через 30 мин МТ образуют густую кольцевую сеть, при этом, в отличие от контрольных клеток, под воздействием Y-27632 выявляются МТ, которые сильно изгибаются и образуют петли. Актин сконцентрирован в пузырьках и распределен по цитоплазме, пучки и стресс-фибриллы отсутствуют (рис. 5). Под воздействием Y-27632 стресс-фибриллы формируются на стабильных краях клетки и в цитоплазме. В отличие от контрольных клеток стресс-фибриллы в центральной части клетки отсутствуют (рис. 6).

Распластывание мезенхимальных стволовых клеток КРС на субстрате является сложным многостадийным процессом. Кинетика распластывания носит нелинейный характер и состоит из фаз быстрого (P1) и медленного (P2) распластывания. Эти же фазы распластывания описаны для клеток, завершивших процесс дифференцировки: клетки из эпителия почки мартышки линии Vero [11], клетки сердечного эндотелия лягушки ХТН-2 [3]. Фаза быстрого распластывания МСК КРС длится всего 10 мин и характеризуется максимальной скоростью. Далее наступает фаза медленного распластывания, которая не прекращается в течение 3 ч, и характеризуется постепенным уменьшением скорости распластывания. Подавляющее большинство МСК распластывается асинхронно, поляризуется через 1–2 ч и переходит к активной миграции, что в наибольшей степени соответствует динамике клеток Vero [11]. Стоит отметить, что поляризация нормальных фибробластов в других моделях наступает гораздо позднее: через 6–8 часов после начала распластывания [1, 13].

Полная деполимеризация МТ в значительной степени подавляет процесс распластывания МСК, кривая распластывания приобретает линейный вид. Распластывание клеток сопровождается блеббингом в течение всех 3,5 ч наблюдения. По истечении 30 мин активные участки ламеллы начинают разделяться вогнутыми стабильными краями. В клетках под воздействием нокодазола существенно снижается скорость распластывания (табл. 1). Площадь клеток по истечении 3 ч оказывается мень-

ше, чем в контрольных клетках (табл. 2). Однако для фибробластов показано, что конечная площадь распластанных клеток не изменяется при деполимеризации МТ [14]. Эффект полной стабилизации МТ проявляется похожим образом, клетки подвергаются продолжительному блеббингу. Таким образом, баланс системы МТ критичен для нормального процесса распластывания, поскольку даже частичное подавление динамики МТ приводит к значительному замедлению процесса распластывания.

Известно, что киназа ROCK ингибирует ацетилирование МТ, что способствует активной миграции и инвазии клеток [15]. Таким образом, можно предположить, что ингибирование киназы ROCK может замедлять распластывание клеток, опосредованно, через стабилизацию МТ. Однако на стадии распластывания клеток подавление киназы ROCK в значительной степени влияет только на морфологию клеток, когда клетки приобретают звездчатую форму, но не замедляет процесса распластывания (табл. 1). Кроме того, высокие дозы ингибитора на стадии распластывания МСК приводят к значительному увеличению их площади, что также было показано для фибробластов крысы [13]. Таким образом, ингибирование киназы ROCK не влияет на кинетику распластывания, но существенно изменяет морфологию клеток.

Заключение

Выдвижение ламеллы в процессе распластывания осуществляется за счет полимеризации актина на активном краю. Наши данные показывают, что воздействие цитохалазина в низких дозах также замедляет процесс распластывания, способствует изменению морфологии клеток, но не влияет на форму кинетической кривой самого процесса. Похожий эффект проявляет воздействие другого ингибитора полимеризации актина – латрункулина Б. Таким образом, наши результаты укладываются в общие представления о функции актина в процессе распластывания.

Однако стоит отметить, что системы МТ и актинового цитоскелета тесно связаны между собой, поскольку при любом воздействии на систему МТ наблюдаются изменения в формировании актинового цитоскелета. Так, в случае полной разборки и подавлении динамической нестабильности МТ замедляется формирование стресс-фибрилл. При этом полная стабилизация МТ приводит к формированию мощных стресс-фибрилл. В то же время при неполном ингибировании полимеризации актина изменяется морфология системы МТ. Интересно, что при подавлении активно-

сти киназы ROCK, изменения затрагивают в большей степени актиновый цитоскелет, но также и систему МТ.

Таким образом, основную роль в процессе распластывания играют динамичные микротрубочки. Кроме того, важным фактором для правильного распластывания и поддержания морфологических характеристик МСК КРС является взаимодействие систем цитоскелета, а именно микротрубочек и актомиозинового комплекса.

Список литературы

1. Ровенский Ю.А., Васильев Ю.М. Морфогенетические реакции клеток и их нарушения при опухолевой трансформации. М.: Медицина, 2004. С. 376–414.
2. Bliokh Zh.L., Smolianinov V.V. Cinematics of fibroblast spreading. I. Analysis of a population. *Biofizika*. 1977. no. 22. P. 471–479.
3. Ganguly A., Yang H., Sharma R., Patel K.D., Cabral F. The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *J. Biol. Chem.* 2012. No. 287. P. 43359–43369.
4. Dobereiner H.G., Wiggins C.H., Sheetz M.P. Quantification of cell edge velocities and traction forces reveals distinct motility modules during cell spreading. *PLoS One*. 2008. Vol.3. no. 11 P. e3735.
5. Wolfenson H., Iskratsch T., Sheetz M.P. Early events in cell spreading as a model for quantitative analysis of biomechanical events. *Biophys J*. 2014. no. 107. P. 2508–2514.
6. Etienne J., Duperray A. Initial dynamics of cell spreading are governed by dissipation in the actin cortex. *Biophys J*. 2011. no 101. P. 611–621.
7. Xiong Y., Rangamani P., Fardin M.A., Lipshtat A., Dubin-Thaler B., Rossier O., Sheetz M.P., Iyengar R. Mechanisms controlling cell size and shape during isotropic cell spreading. *Biophys J*. 2010. No. 98. P. 2136–2146.
8. Senju Y., Miyata H. The role of actomyosin contractility in the formation and dynamics of actin bundles during fibroblast spreading. *J. Biochem.* 2009. No. 145. P. 137–150.
9. Waterman-Storer C.M., Worthylake R.A., Liu B.P., Burridge K., Salmon E.D. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 1999. No 1. P. 45–50.
10. Goldyn A.M., Kaiser P., Spatz J.P., Ballestrem C., Kemmer R. The kinetics of force-induced cell reorganization depend on microtubules and actin. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2010. Vol. 67. No. 4. P. 241–250.
11. Творогова А.В., Воробьев И.А. Динамические микротрубочки подавляют блэббинг и стимулируют распластывание фибробластов // *Цитология*. 2012. Т. 54. № 10. С. 742–753.
12. Stehbens S., Wittmann T. Targeting and transport: how microtubules control focal adhesion dynamics. *J. Cell. Biol.* 2012. no 198. p. 481–489.
13. Шутова М.С., Александрова А.Ю. Сравнительное исследование распластывания нормальных и трансформированных фибробластов. Роль полимеризации микрофиламентов и актин-миозинового сокращения // *Цитология*. 2010. Т. 52. № 1. С. 41–51.
14. Domnina L.V., Rovinsky J.A., Vasiliev J.M., Gelfand I.M. Effect of microtubule-destroying drugs on the spreading and shape of cultured epithelial cells. *J. Cell Sci.* 1985. No. 74. P. 267–282.
15. Schofield A., Steel R., Bernard O. Rho-associated Coiled-coil Kinase (ROCK) Protein Controls Microtubule Dynamics in a Novel Signaling Pathway That Regulates Cell Migration. *J. Bio. Chem.* 2012. Vol.287. No. 52. P. 43620–43629.