

## МЕХАНИЗМ ГЕНЕРАЦИИ $\text{Ca}^{2+}$ -ОТВЕТОВ НА АДЕНОЗИН МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

Кочкина Е.Н., Черкашин А.П., Котова П.Д.

Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: kate-kochkina@yandex.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

**Аннотация.** Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию пролиферирующих недифференцированных клеток, которые способны к дифференцировке в клетки как минимум костной, хрящевой и жировой тканей. Несмотря на значительный прогресс в исследовании МСК, текущие представления об их рецепторных и сигнальных системах весьма ограничены. В данной работе показано, что аденозин стимулирует  $\text{Ca}^{2+}$  сигнализацию в МСК, выделенных из жировой ткани человека. Установлена пороговая концентрация аденозина, охарактеризованы концентрационные зависимости амплитуды и лаг-периода ответов от концентрации агониста. Данные ингибиторного анализа в сочетании с несущественным влиянием наружного  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Ca}^{2+}$  сигналы, инициируемые аденозином, свидетельствовали о том, что в МСК рецепторы аденозина сопряжены фосфоинозитидным каскадом преимущественно с выбросом депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  при незначительном вкладе входа наружного  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Ключевые слова:** мезенхимные стромальные клетки, аденозиновые рецепторы.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию клеток, включающую недифференцированные мультипотентные клетки, способные к дифференцировке в клетки как минимум костной, хрящевой и жировой тканей. МСК могут быть выделены из многих тканей взрослого организма, однако основными их источниками служат костный мозг и жировая ткань. МСК жировой ткани привлекают особое внимание исследователей по причине доступности их источника.

Большинство работ с МСК направлено на изучение механизмов их дифференцировки и поиск возможностей управления этим процессом, а также на анализ возможного применения МСК в терапевтических целях. Фундаментальным исследованиям сигнальных процессов в этих клетках уделяется гораздо меньшее внимание. При этом естественно полагать, что межклеточные и внутриклеточные коммуникации, паракринные и аутокринные регуляции, вовлекающие различные сигнальные молекулы и рецепторные системы, играют ключевую роль в физиологических процессах, детерминирующих жизнедеятельность МСК.

Известно, что МСК высвобождают АТФ, а на их внеклеточной поверхности функционируют несколько типов эктонуклеотидаз, последовательно гидролизующих АТФ до аденозина ( $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{аденозин}$ ). Также показано, что МСК экспрессируют аденозиновые рецепторы для мониторинга аденозина, который может оказывать регуляторное воздействие на их физиологические функции. Поэтому можно ожидать, что пуринергическая сигнальная система является естественной частью системы регуляции клеточных функций МСК.

Данная работа была посвящена исследованию  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации, инициируемой внеклеточным аденозином в цитоплазме МСК, выделенных из жировой ткани человека.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение МСК из жировой ткани и их культивирование.** МСК человека выделяли из подкожной жировой клетчатки здоровых доноров. Жировую ткань измельчали и смешивали с растворами ферментов коллагеназы I типа (200 ед/мл) (Worthington, США) и диспазы (40 ед/мл) (Sigma, США) в соотношении объема ткани к объему ферментативного раствора 1:2. Суспензию инкубировали при 37 °С в течение 30-60 мин, периодически встряхивали. Затем к полученной суспензии для инактивации ферментов добавляли равный объем среды Advance Stem (HyClone, США), содержащей 10% Advance Stem Supplement (HyClone), и центрифугировали при 200 g 10 мин. Супернатант и верхнюю фракцию адипоцитов удаляли. Осадок ресуспендировали и лизировали эритроциты. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновые фильтры с размером пор 100 мкм (BD Bioscience, США). Клетки ресуспендировали в среде роста (см. ниже), высаживали в чашки Петри в количестве 100 тыс. клеток/мл и инкубировали при 37 °С, 5 %  $\text{CO}_2$ . На следующий день меняли среду для удаления неприкрепленных клеток. Выделенные МСК культивировали на пластиковых чашках Петри (Corning, США) и/или в 12-луночной планшете в среде Advance Stem (HyClone) с 10 % Advance Stem Supplement (HyClone), 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина. При достижении 80 % монослоя клетки пассировали. Клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma) и HyQTase Cell Detachment Solution (HyClone), а затем пассаживали в соотношении 1:3. В экспериментах использовали МСК 2–4 пассажей.

**Подготовка клеток к эксперименту.** Перед экспериментом клетки культивировали в 12-луночный планшет в среде роста (см. выше) без антибиотика в течение 12 ч. Затем клетки двукратно промывали

раствором Версена (Sigma). Для отделения от субстрата клетки инкубировали 2-3 мин в 200 мкл фермента NuQTase (NuClone). Фермент ингибировали добавлением 800 мкл полной ростовой среды, клетки ресуспендировали и помещали в пробирку для центрифугирования. Клетки концентрировали в нижней части пробирки при 50 g в течение 45 с. Клетки прикрепляли с помощью Cell Tak (BD Biosciences, США) на дно фотометрической камеры, представляющей собой покровное стекло (Menzel\_Glaser, Германия) с пластиковыми бортиками, и затем загружали флуоресцентным  $\text{Ca}^{2+}$ -зондом Fluo-4. Для этого клетки инкубировали при комнатной температуре (23-25 °C) в присутствии проникающего аналога Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0,02 %) (Molecular Probes, США) 20 мин, в течение которых гидролиз внутриклеточными эстеразами ацетоксиметилевой группы Fluo-4 AM продуцировал остаточное количество Fluo-4. Затем клетки при 4 °C в течение 40 мин отмывали внеклеточным раствором, содержащим (мМ): 110 NaCl, 5,5 KCl, 2  $\text{CaCl}_2$ , 0,8  $\text{MgSO}_4$ , 10 HEPES, 10 глюкоза, в котором они выдерживались. В экспериментах с пониженным до цитоплазматического уровня содержанием  $\text{Ca}^{2+}$ , 2 мМ  $\text{CaCl}_2$  во внеклеточном растворе заменяли на 0,5 мМ EGTA + 0,4 мМ  $\text{CaCl}_2$ , в этом случае концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  составляла 260 нМ.

**Микрофотометрия.** Эксперименты проводились с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss, Германия), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0,75 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology, США). Помимо осветителя проходящего света микроскоп был оборудован оптоволоконным осветителем для освещения через объектив. Флуоресценция клеток, нагруженных Fluo-4, возбуждалась на длине волны  $480 \pm 5$  нм, а эмиссия регистрировалась в области  $535 \pm 20$  нм. Каждые 0,5 секунды регистрировались последовательные флуоресцентные изображения. Изменение концентрации цитозольного кальция в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции целой клетки ( $\Delta F/F_0$ ). Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США).

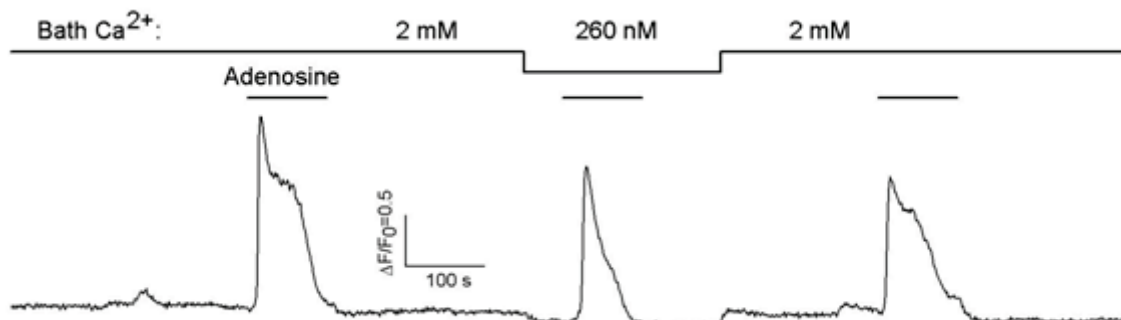
**Фотолиз химических групп (uncaging).** Одновременная загрузка клеток Fluo-4 и фоточувствительным  $\text{Ca}^{2+}$  хелатором NP-EGTA позволила оценивать изменение концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  за счет Fluo-4 и скачкообразно повышать ее в нужный момент за счет NP-EGTA. Стимуляции фотолиза происходила на длине волны 355 нм, для этого один из входов бифуркационного оптического волокна был соединен с лазером LCS-DTL-374QT (Лазер-Экспорт, Россия).

**ОТ-ПЦР.** Для проведения ОТ-ПЦР культивируемые МСК отделяли от субстрата. Из образца, содержащего  $10^5$ - $10^6$  клеток МСК выделяли тотальную РНК с помощью набора RNeasy mini kit (Qiagen), следуя рекомендациям производителя. Изолированную РНК обрабатывали ДНКазой из набора DNA-Free (Ambion). Обратную транскрипцию проводили с использованием случайных праймеров-гексамеров ревертазы Superscript III (Invitrogen) 1 час при 50 °C. Полученную кДНК использовали для ПЦР с ген-специфическими праймерами с использованием готовой смеси для ПЦР с горячим стартом от Евrogen.

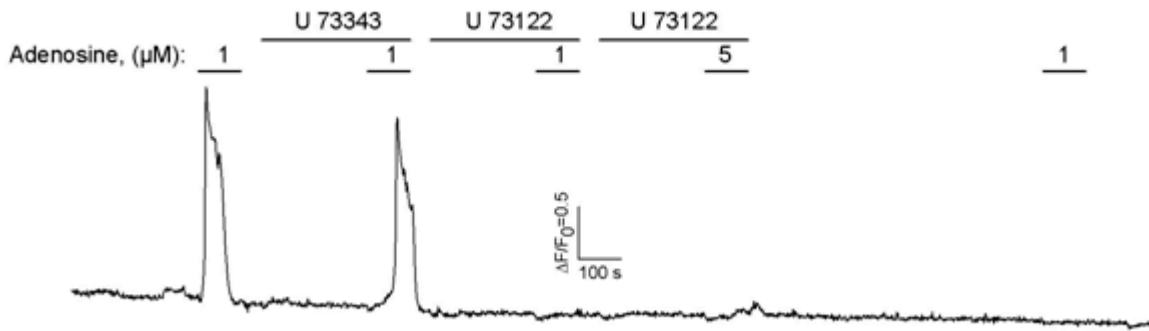
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что популяция МСК гетерогенна по чувствительности к различным агонистам рецепторов, таким как АТР, карбахол, ГАМК, серотонин, норадреналин и др. [7]. В настоящей работе анализировали  $\text{Ca}^{2+}$  сигналы, инициируемые аденозинергическими агонистами в цитоплазме МСК, с использованием метода микрофотометрии ( $\text{Ca}^{2+}$  imaging) и  $\text{Ca}^{2+}$ -индикатора Fluo-4, также анализировали экспрессию генов аденорецепторов с помощью обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и ген-специфических праймеров.

МСК были проанализированы на предмет способности отвечать на аденозин в условиях пониженного до цитоплазматического уровня содержания  $\text{Ca}^{2+}$  (260 нМ). Все протестированные МСК ( $n = 26$ ) генерировали практически нормальные по амплитуде и кинетике ответы на аденозин в среде с пониженным содержанием  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 1). Это свидетельствовало о том, что основной вклад в  $\text{Ca}^{2+}$  ответ на аденозин вносит выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  при незначительной роли  $\text{Ca}^{2+}$  входа.



**Рисунок 1.** Репрезентативная регистрация ответов одиночной МСК, демонстрирующая незначительное влияние наружного  $\text{Ca}^{2+}$  на чувствительность МСК к аденозину (2 мкМ). Верхняя линия иллюстрирует изменение концентрации внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$



**Рисунок 2.** Репрезентативная регистрация ответов одиночной МСК, демонстрирующая вклад фосфоинозитидного каскада в  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы МСК на аденозин. Ответы МСК на аденозин не подавляются неактивным аналогом ингибитора фосфолипазы С U73343 (2 мкМ), но полностью и необратимо подавляются ингибитором фосфолипазы С U73122 (2 мкМ)

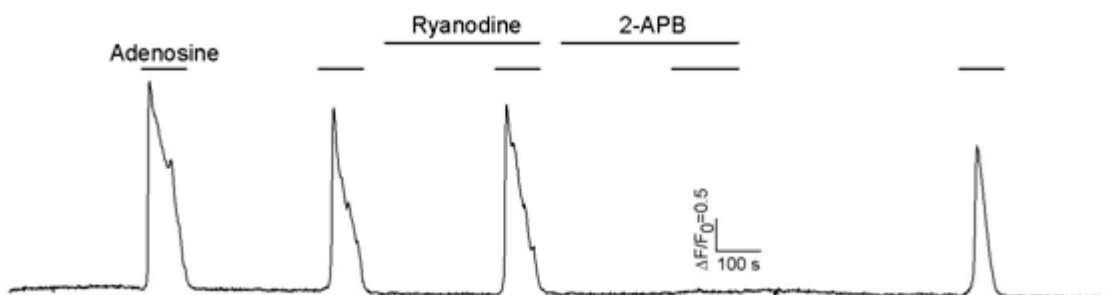
В экспериментах, где МСК ( $n = 17$ ) предварительно инкубировали в присутствии ингибитора фосфолипазы С (U73122),  $\text{Ca}^{2+}$  ответы на аденозин полностью и необратимо подавлялись (рис. 2). Действие U73122 в данном случае можно считать специфичным, т.к. предварительная инкубация тех же клеток с его неактивным аналогом (U73343) в той же концентрации не влияла на их способность отвечать на аденозин. Данный факт позволяет сделать однозначный вывод об участии фосфолипазы С в генерации МСК  $\text{Ca}^{2+}$  ответов на аденозин.

Известно, что в различных клетках высвобождение депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  происходит при стимуляции рианодиновых или  $\text{IP}_3$ -рецепторов, являющихся лиганд-активируемыми  $\text{Ca}^{2+}$  каналами эндоплазматического ретикулума [1, 2]. Предварительная инкубация МСК с антагонистом  $\text{IP}_3$ -рецепторов (2-APB) приводила к обратимому подавлению ответов на аденозин, тогда как ингибитор рианодиновых рецепторов (Ryanodine) не влиял на способность клеток генерировать ответы на аденозин ( $n = 12$ ) (рис. 3). Помимо  $\text{IP}_3$ -рецепторов 2-APB также может блокировать вход наружного  $\text{Ca}^{2+}$ , в частности, через ионные каналы TRPC типа [4, 8, 10]. В нашем же случае ответы генерировались независимо от входа наружного  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 2) и возможным влиянием блокады входа наружного  $\text{Ca}^{2+}$  можно было пренебречь.

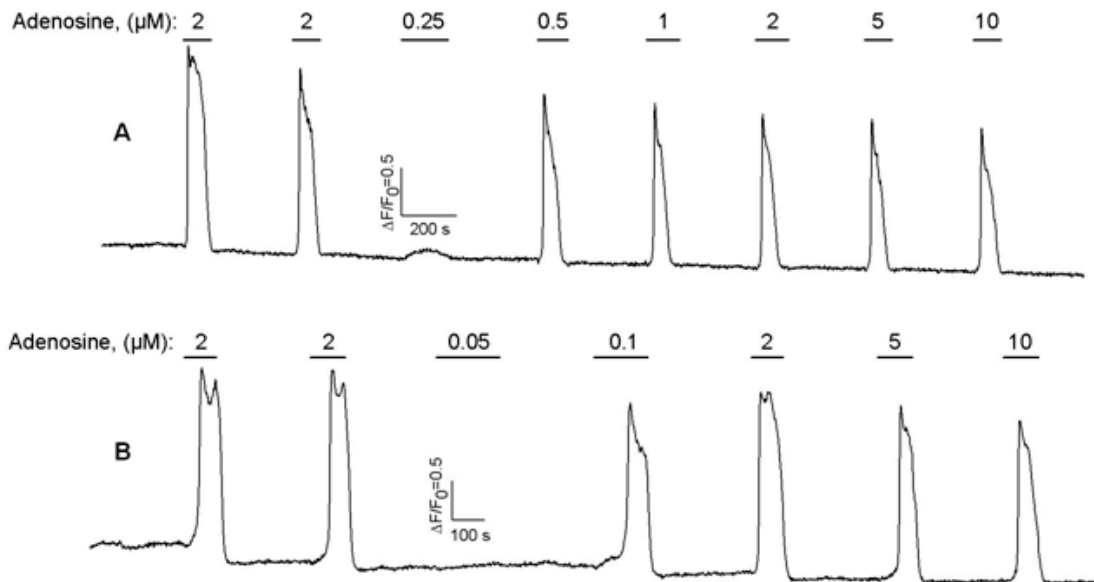
Таким образом, совокупность представленных данных (рис. 1-3) свидетельствует о том, что трансдукция аденозинового сигнала протекает в основном за счет высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, опосредованного работой фосфолипазы С и активацией  $\text{IP}_3$  рецепторов. Иными словами, генерация  $\text{Ca}^{2+}$  ответов МСК на аденозин протекает при участии классического фосфоинозитидного пути.

В феноменологии ответов МСК на аденозин была замечена интересная особенность: амплитуда генерируемых  $\text{Ca}^{2+}$  ответов фактически не зависела от концентрации аденозина ( $n = 21$ ) (рис. 4). Иначе говоря, аденозин никогда не вызывал детектируемых ответов при концентрациях ниже пороговой (50-500 нМ), в то время как при более высоких концентрациях аденозин вызывал максимальный или почти максимальный  $\text{Ca}^{2+}$  ответ. На рисунке 4А представлена регистрация  $\text{Ca}^{2+}$  ответов МСК на аденозин в широком диапазоне концентраций, на рисунке 4В концентрация аденозина в пороговой области изменялась с шагом 50 нМ.

Еще одной характерной чертой ответов на аденозин было то, что они были заметно отсрочены от момента аппликации агониста, и длительность задержки ответа падала с повышением концентрации агониста ( $n = 11$ ) (рис. 5). Так, например, задержка ответов на пороговую концентрацию аденозина (0,1 мкМ) у клетки, представленной на рисунке 5А, составляла 106 с, тогда как при стимуляции ее аденозином в насыщающей концентрации (2 мкМ) она падала до 23 с, амплитуда же ответов при этом оставалась постоянной.



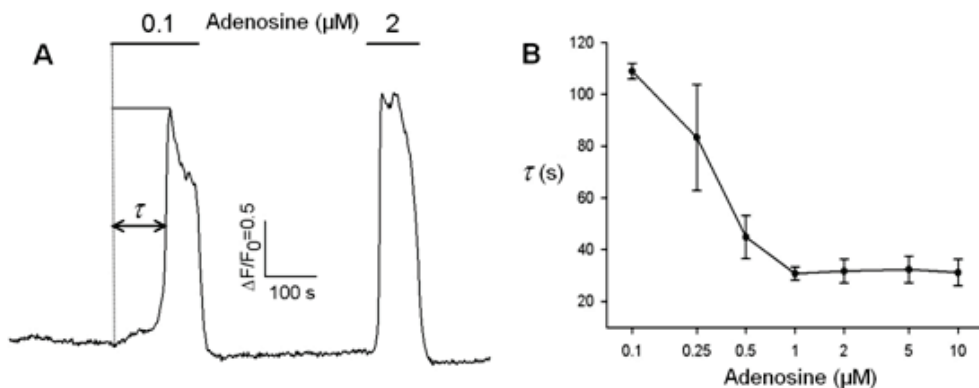
**Рисунок 3.** Репрезентативная регистрация ответов одиночной МСК, демонстрирующая вклад  $\text{IP}_3$ -рецепторов в генерацию ответов на аденозин (2 мкМ), и отсутствие вклада рианодиновых рецепторов. Антагонист  $\text{IP}_3$  рецепторов (2-APB, 50 мкМ) полностью подавляет ответы на аденозин, в то время как ингибитор рианодиновых рецепторов (Ryanodine, 50 мкМ) не влияет на способность МСК генерировать ответы на аденозин



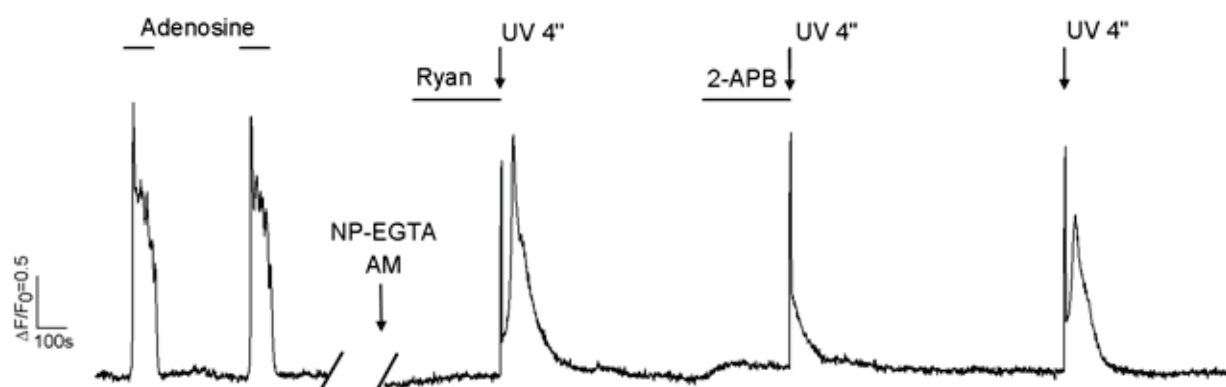
**Рисунок 4.** Репрезентативные регистрации ответов одиночных МСК, демонстрирующие генерацию ответов МСК на аденозин по принципу “все или ничего”

Ответы МСК на аденозин, амплитуда которых следует принципу “все или ничего” и при этом задержка ответа градуально падает с концентрацией агониста, едва ли могут быть объяснены, если предположить, что трансдукционный процесс включает только стимуляцию фосфолипазы С и продукцию  $IP_3$ , который в свою очередь стимулирует высвобождение депонированного  $Ca^{2+}$  через  $IP_3$ -рецепторы. Поэтому мы предположили, что для генерации  $Ca^{2+}$  ответов на аденозин МСК используют два различных механизма. А именно, на первом этапе агонист вызывает небольшой  $Ca^{2+}$  сигнал, вероятно градуально зависящий от концентрации агониста (фосфоинозитидный каскад), а при достижении этим  $Ca^{2+}$  сигналом порогового значения, он усиливается до насыщающего с помощью  $Ca^{2+}$ -зависимого триггерного механизма. Возможно, эту роль играет описанный во многих работах механизм  $Ca^{2+}$ -индуцированного выброса  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ( $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release, CICR) [1, 2, 5].

Если эта идея верна, то любое (независимое от аденозина) достаточно быстрое и превышающее порог повышение внутриклеточного  $Ca^{2+}$  должно подхватываться механизмом  $Ca^{2+}$ -индуцированного выброса  $Ca^{2+}$  и преобразовываться в насыщающий  $Ca^{2+}$  ответ, подобный ответу на аденозин. Для проверки этого предположения мы анализировали реакцию аденозинэргических МСК на скачкообразное повышение внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . С этой целью клетки одновременно загружались Fluo-4 и фоточувствительным  $Ca^{2+}$  хелатором NP-EGTA. Облучение хелатора в ультрафиолетовом (UV) диапазоне приводит к разрушению координационной сферы связывания  $Ca^{2+}$  и к его высвобождению [9], тем самым скачкообразно повышая уровень свободного  $Ca^{2+}$  в цитоплазме клетки. И действительно, вспышки ультрафиолета продолжительностью 4 секунды приводили МСК к генерации  $Ca^{2+}$  ответов по амплитуде и форме сходных с ответами на аденозин (рис. 6). Никакой из известных  $Ca^{2+}$ -зависимых механизмов не способен так усилить и придать такую форму первичному  $Ca^{2+}$  сигналу, вызванному фотолизом NP-EGTA, кроме механизма CICR.



**Рисунок 5.** Зависимость задержки ответов МСК на аденозин от его концентрации: А – репрезентативные ответы одной МСК на аденозин в концентрациях 0,1 мкМ (пороговая) и 2 мкМ (насыщающая). Приведенные ответы имели задержку от момента аппликации аденозина 106 и 23 с соответственно. Длительность задержки ( $\tau$ ) рассчитывалась как время, необходимое для достижения ответом половины своего максимального значения. В – зависимость длительности задержки от концентрации аденозина. На рисунке представлены средние значения времени задержки  $\pm$  стандартная ошибка ( $n = 2-11$ )



**Рисунок 6.** Репрезентативная регистрация ответов одиночной аденозинергической МСК, демонстрирующая вклад  $IP_3$  рецепторов в генерацию  $Ca^{2+}$ -индуцированного выброса  $Ca^{2+}$ , и отсутствие такового у риаинодиновых рецепторов. Ингибитор риаинодиновых рецепторов (Ryanodine, 50 мкМ) не влияет на генерацию  $Ca^{2+}$  ответов на скачкообразное повышение концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  (UV), антагонист же  $IP_3$  рецепторов (2-APB, 50мкМ) полностью подавляет эти ответы

На данный момент известно, что лавинообразный процесс CICR может происходить при участии  $IP_3$  рецепторов и/или риаинодиновых рецепторов, которые оба являются  $Ca^{2+}$ -зависимыми  $Ca^{2+}$ -каналами, функционирующими в эндо/саркоплазматическом ретикулуме [3, 5, 6]. Для выяснения вклада этих внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -каналов в CICR, индуцированном скачкообразным повышением концентрации цитоплазматического  $Ca^{2+}$ , нами использовались ингибитор риаинодиновых рецепторов (ryanodine) и антагонист  $IP_3$  рецепторов (2-APB). В присутствии ингибитора риаинодиновых рецепторов исследуемые клетки продолжали генерировать полноценные  $Ca^{2+}$  ответы на импульсное высвобождение  $Ca^{2+}$  за счет фотолиза NP-EGTA, в то время как 2-APB обратимо подавлял эти ответы ( $n = 7$ ) (рис. 6). Таким образом, в МСК механизм CICR основан преимущественно на положительной обратной связи, формируемой за счет стимуляции  $IP_3$  рецепторов цитоплазматическим  $Ca^{2+}$ .

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-34-00365).

#### Список литературы / References:

1. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2003, pp. 517-529
2. Clapham D.E. Calcium signaling. *Cell.*, 2007, vol. 131, pp. 1047-1058.
3. Dupont G., Combettes L., Leybaert L. Calcium dynamics: Spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level. *Int Rev Cytol.*, 2007. vol. 261, pp. 193-245.
4. Harteneck C., Gollasch M. Pharmacological Modulation of Diacylglycerol-Sensitive TRPC3/6/7 channels. *Curr Pharm Biotechnol.*, 2011, vol. 12, pp. 35-41.
5. Iino M. Spatiotemporal dynamics of  $Ca^{2+}$  signaling and its physiological roles. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*, 2010, pp. 244-256.
6. Kawamoto E.M., Vivar C., Camandola S. Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Front Pharmacol.*, 2012, vol. 3, p. 61.
7. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.*, 2014, vol. 1843, pp. 1899-1908.
8. Mustafa T., Walsh J., Grimaldi M., Eiden L.E. PAC1hop receptor activation facilitates catecholamine secretion selectively through 2-APB-sensitive  $Ca^{2+}$  channels in PC12 cells. *Cell Signal.*, 2010, vol. 22, pp. 1420-1426.
9. Perkins W.J., Kost S., Danielson M. Prolonged NO treatment decreases  $\alpha$ -adrenoreceptor agonist responsiveness in porcine pulmonary artery due to persistent soluble guanylyl cyclase activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2009, vol. 296, pp. L666-L673.
10. Xu S.-Z., Zeng F., Boulay G., Grimm C., Harteneck C., Beech D.J. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol.*, 2005, vol. 145, pp. 405-414.

GENERATION MECHANISM OF  $\text{Ca}^{2+}$ -ANSWERS ON HUMAN ADENOSINE  
MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Kochkina E.N., Cherkashin A.P., Kotova P.D.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,

*Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia: e-mail: kate-kochkina@yandex.ru*

**Abstract.** Mesenchymal stromal cells (MSCs) are a heterogeneous population of proliferating undifferentiated cells that are capable of differentiating into cells of at least bone, cartilaginous and adipose lines. Despite significant progress in the study of MSC, the current understanding of their receptor and signal systems is very limited. In this paper, it is shown that adenosine stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in MSC isolated from human adipose tissue. The threshold concentration of adenosine was determined, dose-dependences of response magnitude and lag-period were characterized. The data of the inhibitor analysis as well as insignificant influence of external  $\text{Ca}^{2+}$  on adenosine responses suggested that in the MSC, adenosine receptors are coupled by the phosphoinositide cascade mainly to  $\text{Ca}^{2+}$  release from  $\text{Ca}^{2+}$  store, while  $\text{Ca}^{2+}$  influx insignificantly contributes to  $\text{Ca}^{2+}$  signaling induced by adenosine.

**Key words:** *mesenchymal stromal cells, adenosine receptors.*