

УДК 576.54 (57.045)

МОДЕЛИРОВАНИЕ МИКРОГРАВИТАЦИИ И СОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ С ГЕМОПОЭТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ РАЗНОНАПРАВЛЕННО МОДУЛИРУЮТ WNT-СИГНАЛИНГ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© 2023 г. А. Ю. Ратушный¹, Е. А. Тырина¹, член-корреспондент РАН Л. Б. Буравкова^{1,*}

Поступило 15.12.2022 г.
После доработки 11.01.2023 г.
Принято к публикации 15.01.2023 г.

Остеогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток (МСК) может определять гомеостаз и физические характеристики костей. Условия микрогравитации снижают способность данных клеток дифференцироваться в остеогенном направлении. При этом *in vitro* показано, что добавление к культуре МСК гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК) может оказывать противоположное действие. Целью данного исследования было выявление транскрипционных изменений 84 генов, ассоциированных с Wnt-сигналингом, в МСК при моделировании микрогравитации и взаимодействии с ГСПК. Полученные результаты указывают на усиление активности неканонического Wnt-сигналинга при сокультивировании МСК с ГСПК, в то время как моделирование микрогравитации способствовало его ослаблению, усиливая каноническую составляющую этого сигнального пути. Данные изменения могут лежать в основе модуляции остеогенного потенциала МСК при межклеточном взаимодействии в условиях микрогравитации.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки (МСК), моделированная микрогравитация, Wnt-сигналинг

DOI: 10.31857/S2686738922600844, EDN: UNDBOY

В условиях длительных космических полетов воздействие невесомости/микрогравитации вызывает у космонавтов целый ряд неблагоприятных изменений, включая потерю костной массы. Причины возникающих отклонений обнаруживаются на клеточном и молекулярном уровнях. Одной из важнейших клеточных популяций, необходимых для поддержания костного гомеостаза, являются мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК). МСК способны давать начало большинству стромальных клеток костного мозга, включая остеобласты/остеоциты, фибробласты и адипоциты. Экспериментальные данные указывают на то, что моделированная микрогравитация (ММГ) ингибирует дифференцировку МСК в остеобластном направлении [1, 2].

Недавние исследования эффектов сокультивирования МСК с гемопоэтическими стволовыми и прогениторными клетками (ГСПК), другим важным элементом ниши костного мозга, выявили противоположные изменения. Было показано, что при взаимодействии с ГСПК стромальные прогениторы усиливают экспрессию генов дифференцировки остеобластного пути [3, 4]. Обнаружение молекулярных механизмов, лежащих в основе разнонаправленности остеогенной программы, может помочь в понимании неблагоприятных изменений состояния костно-мозговой ниши в условиях космического полета (КП).

Исследования на линейных остеоцитах показали, что механорецепция и механотрансдукция могут играть существенную роль в реакции кости на микрогравитацию. Одним из наиболее важных молекулярных сигнальных путей, участвующих в механотрансдукции, является сигнальный путь Wnt/ β -катенин [5].

В настоящее время выделяют три сигнальных каскада, активируемых белками семейства Wnt: канонический (β -катениновый) и два неканони-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: buravkova@imbp.ru

ческих – Wnt/Ca²⁺-сигнальный путь и Wnt/PCP-путь клеточной поляризации (planar cell polarity). Несмотря на важнейшую роль Wnt-сигналинга, данные, касающиеся его значения в регуляции основных физиологических функций МСК, немногочисленны и противоречивы. Канонический и неканонический Wnt-пути передачи сигнала играют важнейшую роль в регуляции пролиферации, остеогенной и адипогенной дифференцировки МСК, причем действие этих путей разнонаправленно [6, 7].

Целью данного исследования было выявление транскрипционных изменений, ассоциированных с Wnt-сигналингом, в МСК при моделировании микрогравитации и взаимодействии с ГСПК. Экспрессию генов анализировали в монокультурах МСК и в сокультуре с гемопоэтическими стволовыми и прогениторными клетками (ГСПК) – важным элементом тканевой ниши костного мозга.

Для экспериментов клетки выделяли из жировой ткани человека и культивировали в среде α -MEM (Gibco, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США), 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”, Россия). Выделенные клетки соответствовали минимальным критериям, предъявляемым к МСК [8]. Криоконсервированные образцы мононуклеаров пуповинной крови (пкМНК) были предоставлены банком стволовых клеток “Криоцентр” (Москва) в рамках договора о научном сотрудничестве. Клетки культивировали в стандартных условиях CO₂-инкубатора (5% CO₂, 37°C, 100% влажность). Исследование одобрено Комиссией по биоэтике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (разрешение № 550/МСК/22/07/20). ПкМНК вносили к МСК в концентрации 2–3 млн/мл в RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, США), с добавлением 2 мМ L-глутамин (“ПанЭко”, Россия), 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и инактивированной 10%-ной ФБС и культивировали совместно в течение 72 ч, как описано ранее [3]. После удаления неадгезированных к стромальным клеткам пкМНК флаконы, содержащие МСК с адгезированными ГСПК, полностью заполняли ростовой средой и культивировали в термостате (37°C) в статическом положении (статический контроль) или закрепленными на устройстве случайного позиционирования – Gravity Controller “Gravite” (Space bio-laboratories, Japan) в термостате (37°C) в течение 14 сут.

Анализировали 4 группы сравнения: МСК в монокультуре и в сокультуре с ГСПК, в статических условиях и при моделировании микрогравитации. Для выделения МСК из ассоциатов с ГСПК использовали иммуномагнитную сепара-

цию с помощью магнитных частиц, связанных с CD45, и LS-колонок (Miltenyi Biotec, Германия).

Для определения уровня экспрессии генов выделяли тотальную РНК с помощью лизирующего реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Для удаления примесей геномной ДНК использовали Ambion RNase-free DNase I (Thermo Fisher, США), после чего осуществляли реакцию обратной транскрипции с использованием MMLV RT kit (Евроген, Россия) согласно инструкциям производителя. Полученную кДНК использовали для проведения количественной ПЦР на приборе Mx3000P (Stratagene, США) с применением коммерческого реагента qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) и планшетов RT² Profiler™ WNT Signaling Pathway PCR Array (Qiagen, Германия). Для нормализации результатов исследования использовали 5 генов домашнего хозяйства – *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*, входящих в состав набора. Уровень относительной экспрессии оценивали с использованием метода 2^{- $\Delta\Delta C_t$} [10].

Достоверность различий между группами оценивали на основе критерия Манна–Уитни (при $p \leq 0.05$).

Анализировали экспрессию 84 генов МСК, ассоциированных с Wnt-сигналингом, при сокультивировании с ГСПК и при ММГ. Во всех группах сравнения была обнаружена выраженная экспрессия 64 генов (рис. 1).

При рассмотрении эффектов ММГ на монокультуру МСК отмечено снижение экспрессии 8 генов. Стоит подчеркнуть, что 7 из них также снижались при моделировании эффектов микрогравитации в МСК, сокультивируемых с ГСПК. Количественные изменения активности большинства генов были сходными в этих двух группах, за исключением *FZD4*. Его экспрессия значительно снижалась в МСК при сокультивировании. Известно, что продукт данного гена задействован в механотрансдукции и положительной регуляции остеогенеза [11].

В целом при воздействии ММГ можно отметить снижение экспрессии некоторых негативных регуляторов канонического Wnt-сигналинга (*NFATC1*, *VANGL2*, *FZD4*) и генов неканонического пути (*AXIN2*, *TLE1*, *KREMEN1*), что указывает на усиление роли канонического каскада (рис. 1, рис. 2).

Более того зафиксировано увеличение экспрессии *WNT1*, также позитивного регулятора канонического Wnt-сигналинга. Увеличение транскрипционной активности *WNT1* при ММГ было показано и на остеоцитах [12]. Известно, что активация канонического пути Wnt/ β -катенина с помощью хлорида лития или экзогенных лигандов, таких как Wnt1, способствует экспансии МСК, но снижает остеогенный и адипогенный потенциал [13]. Таким образом, можно выде-

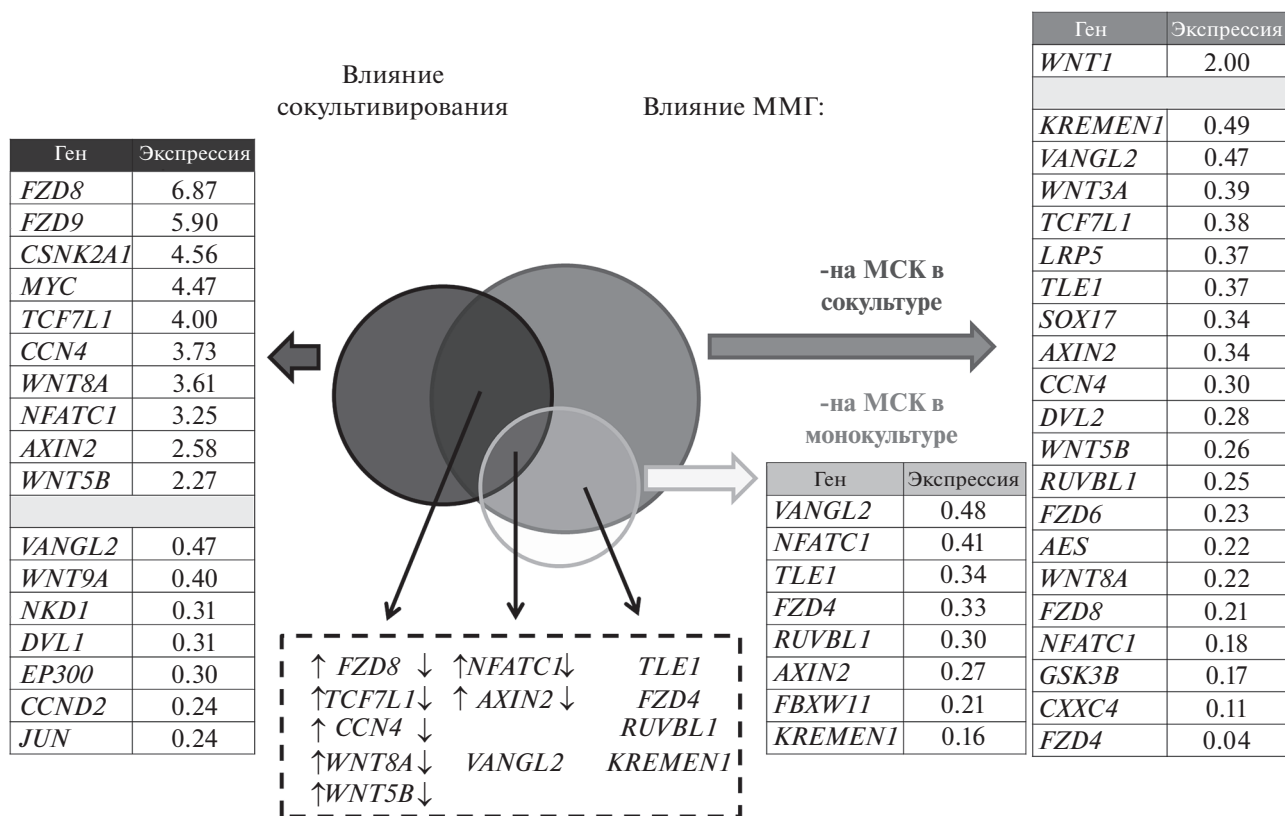


Рис. 1. Относительная экспрессия генов МСК, ассоциированных с Wnt-сигналингом, при сокультивировании с ГСПК и при моделировании эффектов микрогравитации (ММГ). Приведены гены, экспрессия которых значимо ($p \leq 0.05$) изменялась более чем в 2 раза. ↑ – увеличение экспрессии при сокультивировании с ГСПК, ↓ – снижение экспрессии при ММГ. Данные представлены как средние значения, $n \geq 3$.

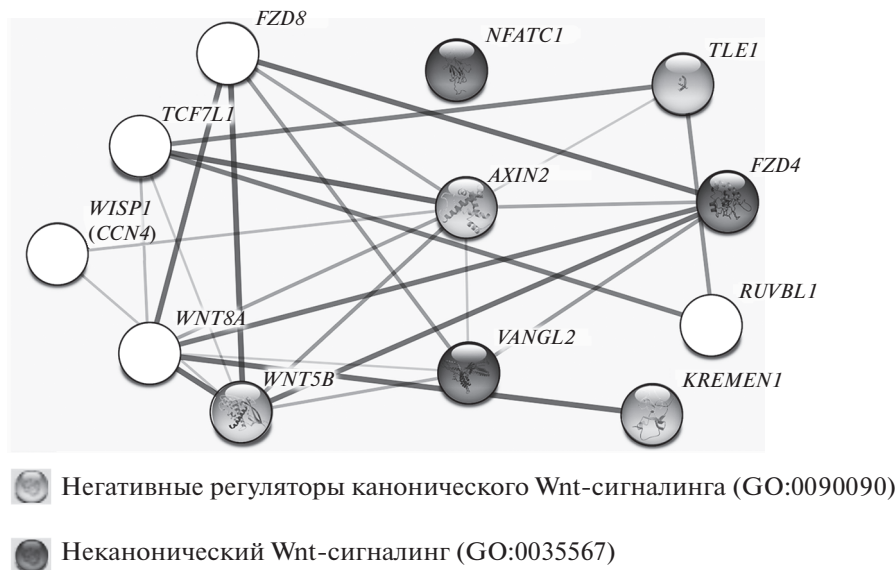


Рис. 2. Сеть генных взаимодействий (STRING).

лить несколько потенциальных генов, ассоциированных с усилением канонического и ослаблением неканонического Wnt-путей, которые могут быть ответственны за снижение остеогенных свойств МСК в условиях ММГ.

Далее мы рассмотрели влияние на МСК сокультивирования с ГСПК и влияние ММГ на МСК в сокультуре с ГСПК. Наше предположение о разнонаправленности эффектов подтвердилось на транскрипционном уровне. Так, сокультивирование с ГСПК привело к увеличению экспрессии 10 генов. В то же время воздействие ММГ на сокультуру нивелировало это повышение для 7 из 10 генов (рис. 1, рис. 2). Среди этих 7 генов можно выделить негативные регуляторы канонического Wnt-сигналинга (*AXIN2*, *WNT5B*), неканонический Wnt-сигналинг (*NFATC1*), а также как минимум 2 гена, которые могут позитивно регулировать остеогенез (*FZD8*, *CCN4*). Показано, что у мышей с недостатком *Fzd8* развивается остеопения вследствие повышенного остеокластогеназа [14], а сверхэкспрессия *CCN4* усиливает про-osteобластное действие BMP-2 на МСК [14].

Таким образом, сокультивирование с ГСПК приводит к повышению экспрессии ряда генов (*FZD8*, *FZD9*, *CSNK2A1*, *MYC*, *TCF7L1*, *CCN4*, *WNT8A*, *NFATC1*, *AXIN2*, *WNT5B*), что свидетельствует об усилении роли неканонического Wnt-каскада и проosteогенном действии. Воздействие ММГ в значительной степени отменяет эффект взаимодействия МСК и ГСПК. Так, происходило снижение до базального уровня (интактные МСК) транскрипционной активности 7 генов (*FZD8*, *TCF7L1*, *CCN4*, *WNT8A*, *NFATC1*, *AXIN2*, *WNT5B*). Также отмечено усиление экспрессии *WNT1*. Обнаруженные транскриптомные изменения указывают на повышение активности канонического Wnt-сигналинга, что может оказывать ингибирующее действие на остеогенез в условиях микрогравитации.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 19-29-04026.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Buravkova L.B., Gershovich P.M., Gershovich J.G., et al.* Mechanisms of gravitational sensitivity of osteogenic precursor cells // *Acta Naturae* (англоязычная версия). 2010. V. 2. № 1 (4). P. 28–35.
2. *Man J., Graham T., Squires-Donnelly G., et al.* The effects of microgravity on bone structure and function // *nprj Microgravity*. 2022. V. 8. № 1. P. 1–15.
3. *Andreeva E.R., Ezdakova M.I., Bobyleva P.I., et al.* Osteogenic Commitment of MSC Is Enhanced after Interaction with Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells In Vitro // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021. V. 171. № 4. P. 541–546.
4. *Jia Y., Zhang C., Zheng X., et al.* Co-cultivation of progenitor cells enhanced osteogenic gene expression and angiogenesis potential in vitro // *Journal of International Medical Research*. 2021. V. 49. № 4. P. 03000605211004024.
5. *Yang X., Sun L.W., Liang M., et al.* The response of wnt/ β -catenin signaling pathway in osteocytes under simulated microgravity // *Microgravity Science and Technology*. 2015. V. 27. № 6. P. 473–483.
6. *Houshyar K.S., Taping C., Borrelli M.R., et al.* Wnt pathway in bone repair and regeneration—what do we know so far // *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019. V. 6. P. 170.
7. *Takam Kamga P., Bazzoni R., Dal Collo G., et al.* The role of notch and Wnt signaling in MSC communication in normal and leukemic bone marrow niche // *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021. V. 8. P. 599276.
8. *Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. 2006. V. 8. № 4. P. 315–317.
9. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method // *methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
10. *Gu Q., Tian H., Zhang K., et al.* Wnt5a/FZD4 mediates the mechanical stretch-induced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018. V. 48. № 1. P. 215–226.
11. *Yang X., Sun L.W., Liang M., et al.* The response of wnt/ β -catenin signaling pathway in osteocytes under simulated microgravity // *Microgravity Science and Technology*. 2015. V. 27. № 6. P. 473–483.
12. *Jothimani G., Di Liddo R., Pathak S., et al.* Wnt signaling regulates the proliferation potential and lineage commitment of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells // *Molecular Biology Reports*. 2020. V. 47. № 2. P. 1293–1308.
13. *Albers J., Keller J., Baranowsky A., et al.* Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin // *Journal of Cell Biology*. 2013. V. 200. № 4. P. 537–549.
14. *Ono M., Inkson C.A., Kilts T.M., et al.* WISP-1/CCN4 regulates osteogenesis by enhancing BMP-2 activity // *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011. V. 26. № 1. P. 193–208.

SIMULATED MICROGRAVITY AND COCULTURING WITH HEMATOPOIETIC CELLS OPPOSITELY MODULATE WNT SIGNALING IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

A. Y. Ratushnyy^a, E. A. Tyrina^a, and Corresponding member of RAS L. B. Buravkova^{a,#}

^a *Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: buravkova@imbp.ru*

The osteogenic potential of mesenchymal stromal cells (MSCs) can determine the bone homeostasis and the physical characteristics of bones. Microgravity reduces the ability of these cells to differentiate in osteogenic direction. It has been shown that the addition of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) to MSC culture in vitro can have the opposite effect. The aim of this study was to identify transcriptional changes in 84 genes associated with Wnt signaling in MSCs during microgravity simulation and interaction with HSPCs. The results indicate an increase in the non-canonical Wnt signaling activity during MSCs and HSPCs cocultivation, while simulated microgravity enhances the canonical component of this signaling pathway. These changes may underlie the modulation of osteogenic potential of MSCs in hematopoietic niche under microgravity.

Keywords: mesenchymal stromal cells (MSCs), simulated microgravity, Wnt signaling