

УДК 57.085.23:576.536

# Механизмы гравитационной чувствительности остеогенных клеток-предшественников

Л.Б. Буравкова, П.М. Гершович, Ю.Г. Гершович\*, А.И. Григорьев

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76 А

\*E-mail: juliet\_g@mail.ru

**РЕФЕРАТ** В обзоре представлен подробный анализ современных данных о механической и гравитационной чувствительности остеобластов и остеогенных клеток-предшественников *in vitro*. Обобщены многочисленные примеры реакций клеток остеобластического фенотипа и остеогенных клеток-предшественников и особенности их функционирования в ответ на изменение механического и гравитационного окружения. Обсуждаются возможные пути передачи сигналов и механизмы гравитационной восприимчивости остеогенной клетки. Показано, что наиболее ранние мультипотентные стромальные клетки-предшественники костного мозга взрослого организма могут быть чувствительны к изменению напряженности механического и гравитационного поля в модельных условиях, что может иметь определенное значение в механизмах развития остеопении в невесомости.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** остеопения, гравитационная чувствительность клетки, микрогравитация, остеобласты, остеогенные клетки-предшественники, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, дифференцировка, цитоскелет.

В ходе эволюции костная система наземных позвоночных формировалась в среде, где одним из главных и неизменно действующих факторов является гравитация, определившая морфогенез и строение населяющих сушу существ. Определенные отделы скелета участвуют в поддержании позы и совершении активных локомоций, постоянно испытывая статические и динамические нагрузки «под знаком преодоления влияния силы тяжести». С началом освоения человеком космического пространства вопрос о влиянии микрогравитации на костную систему приобрел особую значимость, поскольку при недостатке механической нагрузки (микрогравитация, гипокинезия, гиподинамия, иммобилизация) масса костной ткани может уменьшаться в результате снижения потока механических импульсов и опосредованных гравитацией деформаций, как следствие нарушения сопряжения процессов костного ремоделирования [1, 2].

Работы, выполненные в последнее десятилетие, убедительно продемонстрировали чувствительность культивируемых клеток остеобластического фенотипа к фактору микрогравитации [3–8]. Открытым остается вопрос: как может влиять микрогравитация на различные аспекты функционирования менее зрелых клеточных форм, а именно прогениторных клеток.

В постнатальном развитии основным источником клеток-предшественников является костный мозг, который в своем формировании и функционировании тесно связан с костной тканью. Среди многочисленных компонентов

стромы костного мозга выделяют минорную популяцию клеток, которые локализуются в периваскулярной области костного мозга, но отличаются от эндотелиальных и гладкомышечных клеточных элементов экспрессией некоторых поверхностных антигенов и способностью дифференцироваться в клетки тканей мезенхимного происхождения, т.е. обладают всеми характеристиками мультипотентных мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (ММСК) [9, 10]. Впервые полученные из костного мозга животных в 70-х годах XX в. А.Я. Фриденштейном с коллегами, позднее ММСК были обнаружены и выделены из костного мозга человека. Целый ряд исследований продемонстрировал, что *in vitro* ММСК способны дифференцироваться в клеточные элементы костной, хрящевой и жировой тканей, а также поддерживать и регулировать гемопоэз [11–13]. Хорошо известно, что остеобласты различной степени зрелости могут обладать неодинаковым уровнем восприятия механического воздействия [14, 15], в то же время представления о механизмах гравитационной чувствительности наименее коммитированных клеток, локализованных в костной ткани, только недавно получили свое развитие.

## ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ВЛИЯНИЯ ГРАВИТАЦИОННОГО ФАКТОРА НА УРОВНЕ КЛЕТКИ

Сопоставление результатов, полученных в опытах на клетках и тканях *in vitro*, с изменениями, происходящими в организме человека под влиянием микрогравитации, позволяет дифференцировать и оценить роль собственно кле-

точных реакций в развитии тех или иных физиологических реакций, вне влияния интегративных регулирующих систем организма. Эволюция взглядов на возможность существования гравитационной чувствительности клетки *per se* представлена в ряде работ [16–20]. Дискуссии относительно способности изолированной клетки или клеточной популяции *in vitro* воспринимать изменения гравитационного поля не утихают и по сей день. Тем не менее накоплен обширный экспериментальный материал, который неоспоримо свидетельствует в пользу чувствительности различных типов культивируемых клеток к гравитационному фактору. В частности, показано, что в условиях микрогравитации у клеток развиваются многочисленные, часто обратимые морфофункциональные изменения, включающие ремоделирование элементов цитоскелета, изменение экспрессии генов и мозаичную перестройку внутриклеточных систем регуляции, подробный анализ которых представлен в обзорах [5, 19, 21, 22].

По-видимому, в неспециализированных клетках млекопитающих все же существуют структуры, которые могут претендовать на роль «гравитационных сенсоров» и «чувствовать» величину напряженности механического поля, а многие внутриклеточные процессы могут быть зависимыми от величины силы тяжести. Наиболее вероятными кандидатами на роль этих структур выступают различные элементы цитоскелета, ядро, внутриклеточные органеллы, а также некоторые поверхностные рецепторы клеток (интегрины), взаимодействующие с отдельными компартаментами цитоскелета и со структурами внеклеточного матрикса. Эти структуры способны воспринимать возникающие в матриксе напряжения и деформации под действием гравитационного или механического воздействия, передавая их внутриклеточным посредникам, которые опосредуют соответствующую реакцию клеток на микрогравитацию [18, 23, 24]. На основе некоторых теоретических и практических выкладок предполагается, что гравитационная чувствительность клеток, растущих в культуре на твердом субстрате, есть функция от двух переменных параметров: степени адгезии клеток к субстрату и надежности межклеточных взаимодействий, а реализация этих взаимодействий находится в прямой зависимости от затрачиваемых на них энерготрат [17]. Опосредованное влияние микрогравитации на клеточном уровне может проявляться в изменении физико-химических параметров среды обитания клеток, и прежде всего процессов конвекции, седиментации и разности концентрационных градиентов, которые являются гравитационно-зависимыми и, следовательно, могут по-другому протекать в условиях микрогравитации [20, 25].

### **МЕХАНИЧЕСКАЯ И ГРАВИТАЦИОННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК КОСТНОЙ ТКАНИ: ВЛИЯНИЕ НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК**

Долгое время в науке доминировали представления о том, что остециты и сохраняющие с ними контакты зрелые неактивные остеобласты являются наиболее вероятными механосенсорными клетками костной ткани [14, 15]. Предполагается, что этот процесс реализуется с помощью клеточных контактов, образованных интегринами, которые взаимодействуют внутриклеточно с элементами актинового цитоскелета клетки (актин, винкулин и т.п.), а вне-

клеточно – с различными белками внеклеточного костного матрикса, формируя непрерывную сеть, пронизывающую остециты и костный матрикс, и что такая всеобъемлющая и всепроникающая структура способна воспринимать и потенцировать действие даже ничтожно малых механических стимулов [26].

На культурах костных клеток было показано, что такие виды механической стимуляции, как пульсирующий поток жидкости (pulsatile fluid flow) или механическая деформация (strain), могут служить стимулом для запуска каскада регуляторных реакций, включая транзиторное увеличение продукции низкомолекулярных мессенджеров, таких как оксид азота – NO, экспрессию индуцибельной простагландин-синтазы (Cox-2) и секрецию простагландинов (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), необходимых для увеличения внутриклеточной концентрации кальция и запуска инозитол-3-фосфатного пути [27], а также увеличение уровня цАМФ и IGF-I и запуска процессов пролиферации и дифференцировки костных клеток [15], либо активации костного (ре)моделирования [28]. Тем не менее эффекты, вызываемые различными видами механостимуляции, не равнозначны [29, 30], а клетки различной степени зрелости могут как одинаково [28], так и по-разному отвечать на одни и те же механические воздействия [14, 15]. Такая избирательность и варибельность реакций костных клеток на различные виды стимуляции, по-видимому, обусловлена как неодинаковой локализацией дифференцирующихся и зрелых клеток в пределах костной ткани *in situ*, так и разным уровнем их зрелости и спектром выполняемых ими функций.

Известно, что пролиферативная активность остеобластов регулируется широким набором биологически активных веществ, а также механическими сигналами. В частности, показано, что активация экспрессии Cox-2 и продукция PGE<sub>2</sub> происходит у остеобластов в ответ на действие факторов роста (TGF-β) и необходима для перехода клеток из G1-фазы в S-фазу репликации ДНК и последующей активной пролиферации [5]. Интересно, что как механическая стимуляция различного характера, так и гипергравитация [31] способны вызывать увеличение продукции PGE<sub>2</sub>, что свидетельствует о значении PGE<sub>2</sub> в анаболическом действии механического стресса. Удивительно и то, что в некоторых исследованиях, выполненных в условиях микрогравитации, было выявлено как увеличение продукции PGE<sub>2</sub>, так и уменьшение экспрессии мРНК Cox-2 и продукции PGE<sub>2</sub> на фоне пониженного роста клеток в условиях микрогравитации [5], что сопровождалось нарушениями в структуре актинового цитоскелета клеток.

Исследования, посвященные изучению влияния механического стресса на прогениторные клетки, представляют особый интерес. Установлено, что ММСК человека экспрессируют как Cox-1, так и Cox-2, причем вырабатывают PGE<sub>2</sub> на более высоком уровне, чем полученные из них остеобластоподобные клетки. Кроме того, обнаружено, что повышенная продукция данного метаболита у ММСК связана с более высоким уровнем экспрессии мембранно-связанной простагландин-синтазы, причем эндогенная продукция PGE<sub>2</sub> регулирует у них выработку остеогенного фактора роста – BMP-2 [32]. По-видимому, ММСК наряду со зрелыми остеобластами и остеоцитами вполне могут претендовать на роль механочувствительных клеток кост-

ной ткани, поскольку анизотропная одноосевая механическая деформация ММСК, высаженных на специальные эластичные мембраны, приводит к глобальному изменению паттерна экспрессии генов, снижает активность некоторых путей сигнальной трансдукции (Jagged1) и активирует клеточную пролиферацию [33]. Таким образом, доминировавшие некоторое время в науке представления о том, что низкодифференцированные клетки костной ткани не могут или практически не способны воспринимать механические стимулы, очевидно, должны быть существенно скорректированы. Следует отметить, что данные, описывающие изменения пролиферативной активности клеток остеобластического фенотипа в условиях измененной гравитации, достаточно противоречивы. Описано ингибирование пролиферации остеобластных клеток, как в условиях микрогравитации, так и при ее моделировании [6, 34, 35]. Использование модели Random Positioning Machine (RPM) не приводило к ухудшению роста преостеобластов мыши 2Т3 [36]. Пролиферативная активность ММСК в процессе их остеогенной дифференцировки в ротационном био-реакторе не менялась [37], уменьшалась при экспозиции на клиностае [38] и даже возрастала при культивировании на 3D-клиностае [39].

По-видимому, наиболее вероятным сценарием влияния микрогравитации на остеогенные клетки-предшественники является изменение нормальной реакции клеток на анаболическое действие факторов роста. В настоящее время многие исследователи придерживаются мнения о том, что наблюдаемые клеточные реакции обусловлены не физической потерей рецепторов для факторов роста (например, EGF, PDGF), а, скорее, изменениями в системе трансдукции сигналов в условиях микрогравитации [5, 40]. Эта точка зрения заставила ученых обратить самое пристальное внимание на возможные внутриклеточные механизмы и пути сигнализации. По современным представлениям, главные пути реализации всех трех основных направлений дифференцировки ММСК включают активацию/репрессию MAP-киназных каскадов (митоген-активируемых протеинкиназ) [41]. Показано, что активация классического MAP-киназного каскада (ERK1/2) происходит главным образом через Ras-зависимый путь сигнальной трансдукции в ответ на связывание рецепторов с факторами роста [41]. Предполагается, что такие факторы роста, как BMP-2 и IGF-I, реализуют свое позитивное митотическое влияние на ММСК через активацию MAP-киназного каскада, кроме того, в этом процессе задействована протеинкиназа D, но не протеинкиназа C [42]. Интересно, что увеличение пролиферации ММСК при действии пульсирующего потока жидкости также происходит за счет кальциевой сигнализации и MAP-киназного каскада, что свидетельствует о наличии универсального механизма трансформации механических сигналов в биохимические у остеогенных клеток-предшественников различной степени зрелости [43].

### **РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ АДГЕЗИИ В РЕГУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ АСПЕКТОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И ВОСПРИЯТИИ МЕХАНИЧЕСКИХ И ГРАВИТАЦИОННЫХ СТИМУЛОВ**

Весьма важным может быть вопрос о сохранности иммунотипа клеток-предшественников в условиях изменен-

ной гравитации. Изучаемый вопрос интересен с нескольких точек зрения: во-первых, основные CD-кластеры, экспрессируемые на мембране ММСК, регулируют различные стороны функционирования клеток-предшественников, поскольку представляют собой поверхностные рецепторы для факторов роста, опосредуют взаимодействия ММСК с гемопоэтическими предшественниками и лимфоцитами и таким образом модулируют созревание и активность последних, принимают участие во взаимодействии клеток с молекулами внеклеточного матрикса [11, 13, 44]. Во-вторых, до сих пор не прояснена роль тех или иных антигенов в реализации уникальных дифференцировочных потенциалов стволовых клеток. Примеры того, может ли влиять моделированная микрогравитация на экспрессию отдельных поверхностных маркеров ММСК, весьма малочисленны и противоречивы. В частности, в одной работе было установлено, что 7-суточное 3D-клиностамирование приводит к увеличению количества клеток в популяции ММСК человека, экспрессирующих антигены стромальных клеток – CD44+, CD90+, CD29+ [39]. В другом исследовании было показано, что 6-суточное горизонтальное клиностамирование вызывает уменьшение числа клеток, несущих антигены CD105 и HLA A,B,C, в культуре ММСК костного мозга человека [45]. Нами было установлено, что 5-суточная экспозиция ММСК на RPM приводит к увеличению доли клеток, экспрессирующих интегрин CD49b, но не влияет на процентное содержание клеток, несущих CD29 [46].

Пожалуй, самым интересным аспектом биологических особенностей иммунотипа остеогенных клеток-предшественников является потенциальное участие определенных антигенов в механизмах механо- и гравиточувствительности. Сформулирована механохимическая гипотеза, согласно которой интегрины и другие рецепторы на поверхности клеток играют важную роль в физическом взаимодействии между внеклеточным матриксом и цитоскелетом клетки и восприятии гравитационных сигналов [23, 24]. В комплексном исследовании, посвященном изучению молекулярных функций интегринов, было показано, что простая кластеризация интегринов на мембране клеток в ответ на сигналы, поступающие из внеклеточного матрикса, является триггером трансмембранной аккумуляции 20 важнейших медиаторов сигнальной трансдукции, включая эффекторные белки цитоскелета – RhoA, Rac, Ras, Raf, MAP-киназа – MEK, ERK и JNK, причем применение цитохалазина D и ингибиторов тирозин-киназ не предотвращало агрегации интегринов с FAK и белками цитоскелета – винкулином, талином и  $\alpha$ -актинином [47].

Наиболее любопытна потенциальная роль некоторых из описанных антигенов в реакции костных клеток на резкое уменьшение «напряженности» механического поля. Доказательство того, что интегрины (в частности,  $\beta$ 1-интегрин или CD29) принимают участие в восприятии механических сигналов остеобластами, было получено при исследовании мышцей, имеющих нормальный уровень экспрессии  $\beta$ 1-интегрина, и трансгенных животных, в геном которых был встроена доминантно негативный ген  $\beta$ 1-интегрина. Взрослые 2-месячные трансгены имели остеопенический фенотип и характеризовались значительным уменьшением массы костной ткани нижних конечностей, а также ухудшением ее силовых и прочностных характеристик при нормаль-

ном уровне костного ремоделирования [48]. Показана активация экспрессии альфа2-интегрина в ходе остеогенной дифференцировки ММСК при моделировании эффектов микрогравитации [49].

В фокусе современных исследований механобиологии находятся не только интегрин, но и другие рецепторы клеточной адгезии, и в особенности CD44 (НСАМ). На культуре остеобластов MC3T3-E1 показано, что механический стресс, вызываемый пульсирующим потоком жидкости, способен приводить к увеличению уровня мРНК остеопонтина, одного из широко распространенных белков костного матрикса, который является лигандом CD44 [50]. Мыши, дефицитные по гену *OPN*, демонстрируют резистентность к уменьшению механической стимуляции в ходе вывешивания и теряют меньше костной массы, чем мыши дикого типа. ММСК из костного мозга вывешенных *OPN*-мышей, культивируемые *ex vivo*, характеризуются нормальной способностью к образованию минерализованных нодулл по сравнению с пониженной минерализацией в культурах, выделенных из обычных мышей после их вывешивания [51]. В этой связи интересно, что 5-суточная экспозиция остеобластов крысы в условиях микрогравитации приводила к уменьшению уровня экспрессии остеопонтина, однако увеличивала уровень экспрессии CD44, при этом экспрессия  $\beta 1$ -интегрина (CD29) в клетках не изменялась [7].

Известно, что CD44 вовлечен в процессы связывания и регуляции активности матриксных металлопротеиназ (MPPs) [52]. ММСК экспрессируют и продуцируют различные типы MPPs (- 2, 3, 10, 11, 13, 14), а механический стресс приводит к возрастанию активности, прежде всего коллагеназы (MPP-13), причем это происходит на посттрансля-

ционном уровне [53]. Описанные работы демонстрируют, что изменение определенного баланса в уровне активности или экспрессии коллагеназ может иметь определенное значение в механизмах созревания и деструкции коллагенового матрикса, в т.ч. и при изменении параметров механического поля.

**МЕХАНИЧЕСКАЯ И ГРАВИТАЦИОННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК КОСТНОЙ ТКАНИ: ВЛИЯНИЕ НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК**

Особое внимание привлекают работы, посвященные изучению различных показателей состояния коллагенового биосинтеза у т.н. механоцитов (прежде всего фибробластов и костных клеток) в условиях повышенного или пониженного значения силы тяжести. Гипергравитация, как правило, приводила к усилению биосинтеза коллагена I типа [54], тогда как в условиях микрогравитации или ее моделирования его экспрессия угнеталась [4, 55]. В нашей работе было обнаружено, что в ходе коммитирования ММСК к остеогенезу, инициированного одновременно с переносом клеток в условия моделированной микрогравитации, происходит замедление выработки органического внеклеточного коллагенового матрикса (коллаген I типа) [56].

Установлена корреляция между уровнем синтеза коллагена и активацией протеинкиназ семейства MAPK, в частности ERK1/2, т.к. ингибирование этого сигнального пути приводит к частичному ухудшению уровня экспрессии и уменьшению белковой продукции одной из цепей коллагена I типа [54]. При коммитировании ММСК к остеогенезу полное отсутствие экспрессии коллагена I типа наряду с изменением в уровне экспрессии интегрин, специфич-

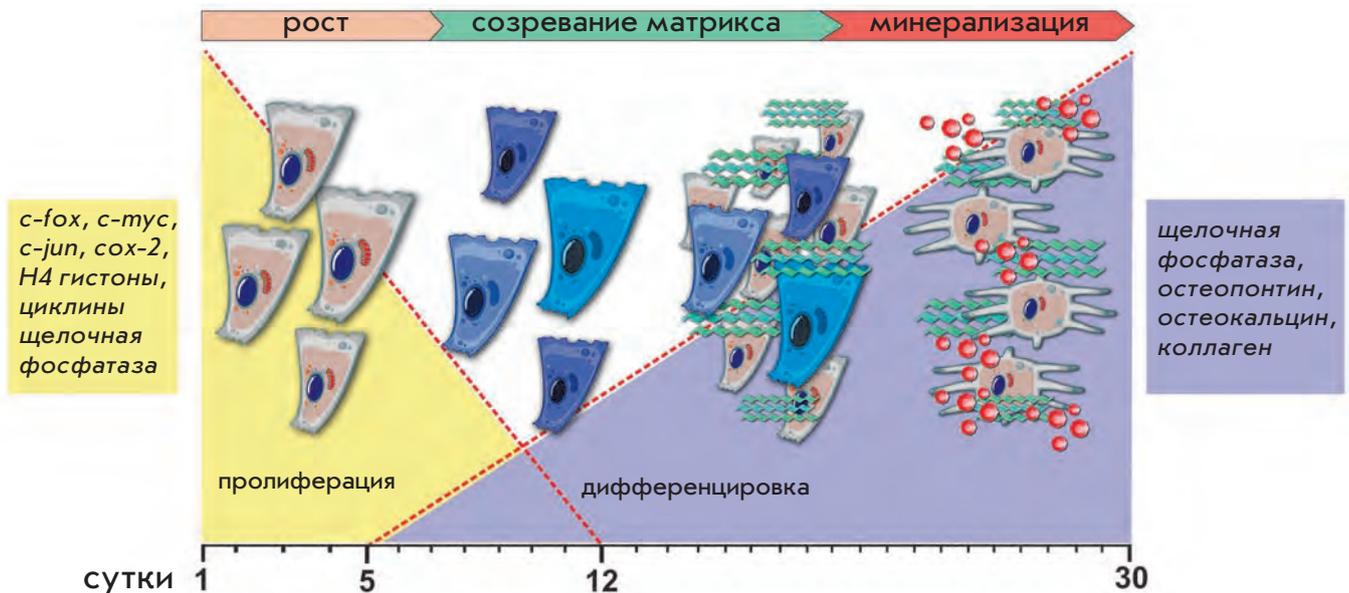


Рис. 1. Взаимоотношения между фазами роста и дифференцировки остеобластов. Ранние стадии роста остеогенных клеток регулируются генами раннего ответа *c-fos*, *c-myc*, *sox-2*, *efr-1*, а также транскрипционными факторами, которые активируются в клетках, вступивших в цикл. В течение поздних этапов пролиферативной фазы и в начальной фазе дифференцировки клеток активируются ген щелочной фосфатазы (ЩФ), коллагена и фибронектина. В середине периода созревания матрикса активируются гены белков, принимающих участие в минерализации, позднее вновь активируется ген щелочной фосфатазы [адаптировано по 5]

ных к коллагену, наблюдалось после семи суток культивирования клеток в ротационном биореакторе, и тогда же у них отмечался пониженный уровень фосфорилирования ERK1/2<sup>МАРК</sup>, тогда как уровень фосфорилирования p38<sup>МАРК</sup>, напротив, возрастал [37, 49].

Показано, что в ходе индуцированного остеогенеза нормальных клеток остеобластического фенотипа активация экспрессии коллагена I типа начинается на пятые-шестые сутки культивирования клеток в остеогенной среде, а пик экспрессии белка приходится в среднем на девятые-четырнадцатые сутки – в конце пролиферативной фазы и начале т.н. периода созревания внеклеточного матрикса (matrix maturation) [57]. Из этого следует, что кратковременные экспозиции клеток в условиях микрогравитации не обязательно должны сопровождаться ингибированием экспрессии достаточно «поздних» фенотипических генов, таких как коллаген. Вероятно, из этого может следовать и то, что экспрессия любого «механочувствительного» белкового продукта остеобластов наиболее уязвима к изменению гравитационного поля на максимуме своей экспрессии, тесно связанной у клеток остеобластического фенотипа с тремя, достаточно четко разделенными во времени, фазами дифференцировки (рис. 1).

Еще одним существенным аспектом влияния микрогравитации на процессы дифференцировки остеогенных клеток является уменьшение уровня экспрессии и активации щелочной фосфатазы, а также ингибирование экспрессии поздних маркерных белков минерализованного костного матрикса, таких как остеокальцин и остеокальцин, что свидетельствует о торможении как начальных, так и поздних этапов дифференцировки остеогенных клеток-предшественников в остеобласты [4, 36, 37, 49, 55, 58]. В костной ткани ЩФ однозначно принимает участие в минерализации костного матрикса, тем не менее до сих пор неясно, как реализуется этот механизм, а точные функции фермента остаются предметом дискуссий [59]. Далеко не всегда удается провести четкую параллель между наблюдаемыми физиологическими эффектами и уровнем активности этого фермента, что указывает на то, что могут существовать и другие пути регуляции образования минерализованного матрикса. В частности, в одной из работ было показано, что механическая стимуляция остеобластов пульсирующим потоком жидкости приводит к увеличению клеточной активности ЩФ, однако это не сопровождалось увеличением уровня минерализации матрикса в культуре [60]. Возможным объяснением может служить недавно сформулированная гипотеза о роли клеток остеогенного ряда в формировании стабильной морфологической структуры костного матрикса, в которой авторы высказывают предположение о том, что сами костные клетки в зависимости от внешних условий при помощи неколлагиновых белков костной ткани (остеоонектин, остеоопонтин, остеокальцин, костный сиалопротеин) регулируют процесс образования аморфных фосфатно-кальциевых ядер минерализации, их созревание и скорость процесса кристаллизации [61]. Интересно, что пониженная экспрессия остеокальцина в условиях моделированной микрогравитации у клеток зачастую сопровождается уменьшением уровня экспрессии ключевого транскрипционного фактора, регулирующего процесс протекания остеогенной диф-

ференцировки остеогенных клеток – Runx2 (runt-related transcription factor 2), который может представлять собой одну из первичных «мишеней» влияния микрогравитации на остеобластический фенотип.

### **УЧАСТИЕ Runx2 В РЕГУЛЯЦИИ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ММСК И ОСТЕОБЛАСТОВ, ЕГО ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВНОЙ «МИШЕНИ» ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИИ**

Runx2/PEBP2aA/Cbfa1, как главный регулятор остеогенной дифференцировки клеток мезенхимного происхождения, реагирующий на действие остеогенных факторов роста, впервые был идентифицирован при изучении остеогенной дифференцировки плюрипотентных мезенхимальных клеток-предшественников мыши линии C2C12 [62]. Для полноценного преобразования клеток в остеобласты и экспрессии специфических остеогенных генов необходима кооперация Runx2 и молекул Smad, активируемых BMP-2. Параллельно было обнаружено, что фактор роста BMP-7 индуцирует экспрессию мРНК Runx2 раньше, чем экспрессию остеокальцина, кроме того, трансфекция изоформой Runx2 приводит к остеогенной дифференцировке не-osteогенных клеток [63].

В настоящее время принято считать, что Runx2 является необходимым, но не единственно достаточным фактором транскрипции остеогенеза, однако в постнатальном развитии остеобластов он в совокупности с некоторыми другими транскрипционными факторами (Osx, Msx, Smad, Dlx) играет ключевую роль в регуляции процессов остеогенной дифференцировки мезенхимных клеток [64, 65]. Преостеобласты, подвергнутые механической деформации, отвечают быстрой активацией экспрессии BMP-2, Runx2 и Smad5, и лишь позднее этот эффект сопровождается возрастанием экспрессии генов, необходимых для образования и созревания матрикса ALP, COL1a1 и OC, OPN [66]. В условиях моделированной микрогравитации идентифицированы «механочувствительные гены» остеобластов, среди которых присутствует и Runx2 [67]. Кроме того, показано, что механическая низкодозовая высокочастотная ежедневная стимуляция (LMHF) преостеобластов способна предотвращать подавление остеогенного дифференцировочного потенциала клеток при моделировании микрогравитации, что сопровождается восстановлением ранее подавленной экспрессии Runx2 [68]. Интересно, что на моделях *in vivo* также было обнаружено, что снижение уровня экспрессии или инактивация Runx2 является одним из главных механизмов влияния гипокинезии на остеобластический фенотип. В частности, у частично нокаутных мышей, гетерозиготных по гену Runx2, вывешивание (unloading) провоцировало более выраженную потерю массы костной ткани по сравнению с мышами дикого типа, имеющими нормальный уровень экспрессии Runx2 [69].

### **РОЛЬ МЕХАНИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ В ВЫБОРЕ ПУТИ КОММИТИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ: PPARγ2 versus Runx2**

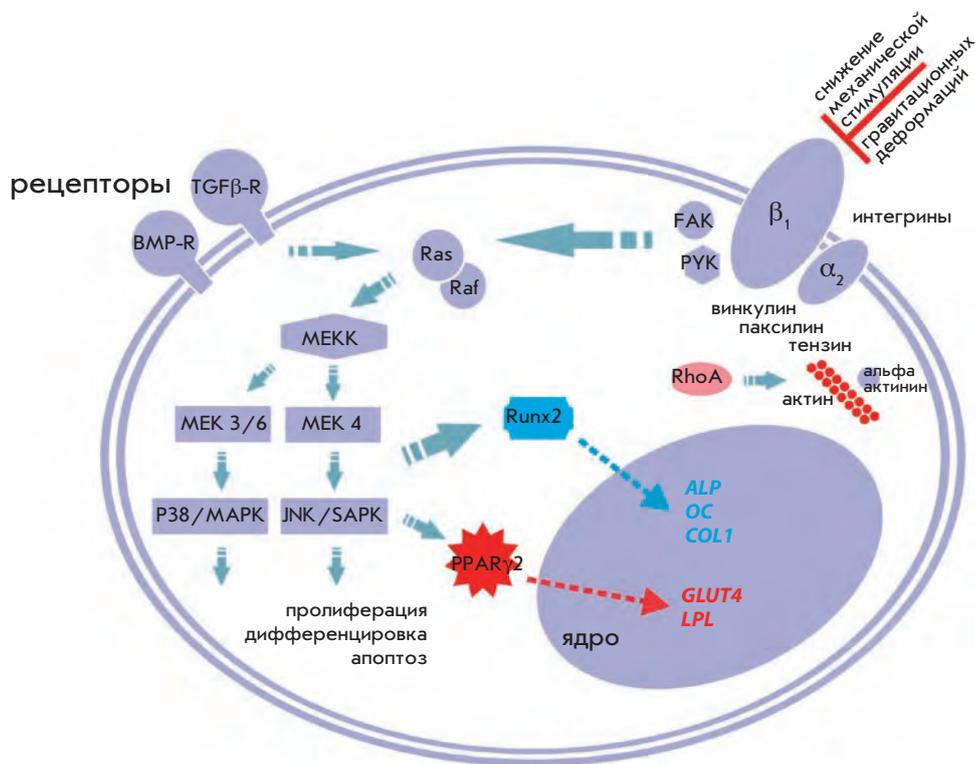
В организме существует удивительная взаимосвязь между остеогенезом и адипогенезом, которая сохраняется и при культивировании клеток-предшественников. Вероятно, столь необычные реципрокные взаимоотношения

между двумя линиями дифференцировки ММСК обусловлены существованием общих сигнальных путей и уровней регуляции, которые определяют приоритет в развитии одного направления в ущерб другому, исходя из поступающих к клеткам сигналов. По крайней мере, некоторые из этих механизмов в настоящее время распознаны.

Ключевым транскрипционным фактором адипогенеза является PPAR $\gamma$ 2, который функционирует как доминантный негативный регулятор остеогенеза [70]. Специфическая активация PPAR $\gamma$ 2 различными естественными и синтетическими лигандами ведет к полной супрессии основных транскрипционных факторов остеогенеза – *cbfa1/Runx2* и *Osterix*, а также увеличению конверсии бипотентных мезенхимальных предшественников в адипоциты, не влияя на морфофункциональное состояние остеобластов на терминальных стадиях их дифференцировки [71]. Хроническое введение агониста PPAR $\gamma$ 2 – росиглитазона приводит к потере массы костной ткани у мышей, что сопровождается возрастанием количества адипоцитов в полости костного мозга и уменьшением соотношения числа остеобластов и остеокластов [72, 73]. Интересно, что с возрастом активность PPAR $\gamma$ 2 у ММСК возрастает, что коррелирует с утратой пула остеобластов и увеличением числа адипоцитов в костном мозге. При этом у клеток уменьшается уровень экспрессии *Runx2* и *Dlx5*, а также *коллагена* и *остеокальцина* [74].

Последнее время активно обсуждается роль механических сигналов в выборе пути коммитирования и реализации многочисленных программ дифференцировки ММСК

[75]. Установлено, что механическое растяжение приводит к уменьшению содержания PPAR $\gamma$ 2 в культуре бычьих ММСК и клеток линии СЗН10Т1/2 [76]. Показано, что механические стимулы приводят к увеличению уровня экспрессии *Msx2*, активирующего остеогенную дифференцировку клеток, проявляющего синергизм с BMP-2 и действующего как супрессор адипогенеза, что выражается в ингибировании PPAR $\gamma$ 2 [77]. Транзиторная активация сигнального пути Wnt/ $\beta$ -Catenin ингибирует адипогенную дифференцировку клеток путем подавления экспрессии *C/EBP $\alpha$*  и PPAR $\gamma$ 2 и активации экспрессии факторов транскрипции остеогенеза – *Runx2*, *Dlx5*, *Osterix* [78]. Доказана возможность вовлеченности Wnt/ $\beta$ -Catenin-сигналикации в ингибирование адипогенеза и стимуляцию остеогенеза клеток в ответ на механическую деформацию, причем показано, что этот процесс реализуется за счет  $\alpha$ -рецепторов эстрогена [79] и несмотря на культивирование клеток в среде с сильными адипогенными индукторами [80]. Интересно, что у остеобластов мыши при моделировании эффектов микрогравитации было обнаружено угнетение уровня экспрессии таких компонентов Wnt/ $\beta$ -Catenin-сигнального пути, как *Sfrp2* и *Wisp2*, что может косвенно указывать на активацию программы адипогенеза в условиях микрогравитации [67]. Также показано, что у ММСК, выделенных из костного мозга вывешенных крыс, и культивируемых *ex vivo*, происходит снижение уровня экспрессии *cbfa1/Runx2* при индукции остеогенной дифференцировки, а при индукции адипогенной дифференцировки эти клетки демонстрируют повышенную экспрессию PPAR $\gamma$ 2 и луч-



**Рис. 2.** Молекулярная регуляция пролиферации и дифференцировки ММСК в зависимости от требований «внешнего механического поля». Внеклеточные сигналы и механические стимулы или их отсутствие реализуют свое действие через соответствующие рецепторы, каналы на поверхности клетки (например, интегрины) и через другие, связанные с поверхностью клетки неизвестные механизмы. Сигналы, идущие от интегринов, поступают к связанным с ними киназам фокальной адгезии (FAK и PYK2), от которых сигналы могут поступать как к митоген-активируемым протеинкиназам (MAPK), регулирующим баланс между важнейшими внутриклеточными процессами, такими как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, так и к эффекторным белкам цитоскелета (паксиллину, талину, винкулину) и Rho-киназам, которые осуществляют реорганизацию структуры цитоскелета клетки. Сигналы, идущие в ядро от Runx2, указаны синим цветом, от PPAR $\gamma$  – оранжевым

ше дифференцируются в адипогенном направлении [81]. Похожие изменения наблюдаются при кратковременной экспозиции ММСК в условиях моделирования эффектов микрогравитации в ротационном биореакторе [37]. Однако в ходе изучения индуцированной адипогенной дифференцировки ММСК в условиях длительного моделирования эффектов микрогравитации не было обнаружено фенотипических признаков возрастания эффективности адипогенеза ММСК [56].

Микрогравитация может модифицировать дифференцировочный потенциал клеток-предшественников вследствие изменений в деятельности основных киназных каскадов сигнальной трансдукции (рис. 2). Установлено, что MAP-киназы играют важную, если не ключевую, роль в регуляции дифференцировочного потенциала клеток мезенхимного происхождения, в т.ч. и в условиях механического стресса [41, 82, 83]. В частности, известно, что MAP-киназы осуществляют фосфорилирование Runx2, необходимое для его транскрипционной активности [84]. В то же время уменьшение/модуляция активности MAP-киназ является достаточно часто наблюдаемой реакцией клеток на моделирование микрогравитации. Показано снижение уровня фосфорилирования ERK1/2<sup>MAPK</sup> в процессе остеогенной дифференцировки ММСК в ротационном биореакторе [37, 38] или уменьшение фосфорилирования p38<sup>MAPK</sup> в процессе остеогенной дифференцировки остеобластов на 3D-клиностае [58].

#### **РОЛЬ АУТОКРИННЫХ СИГНАЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ И ВЫБОРЕ ПУТИ КОММИТИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИИ**

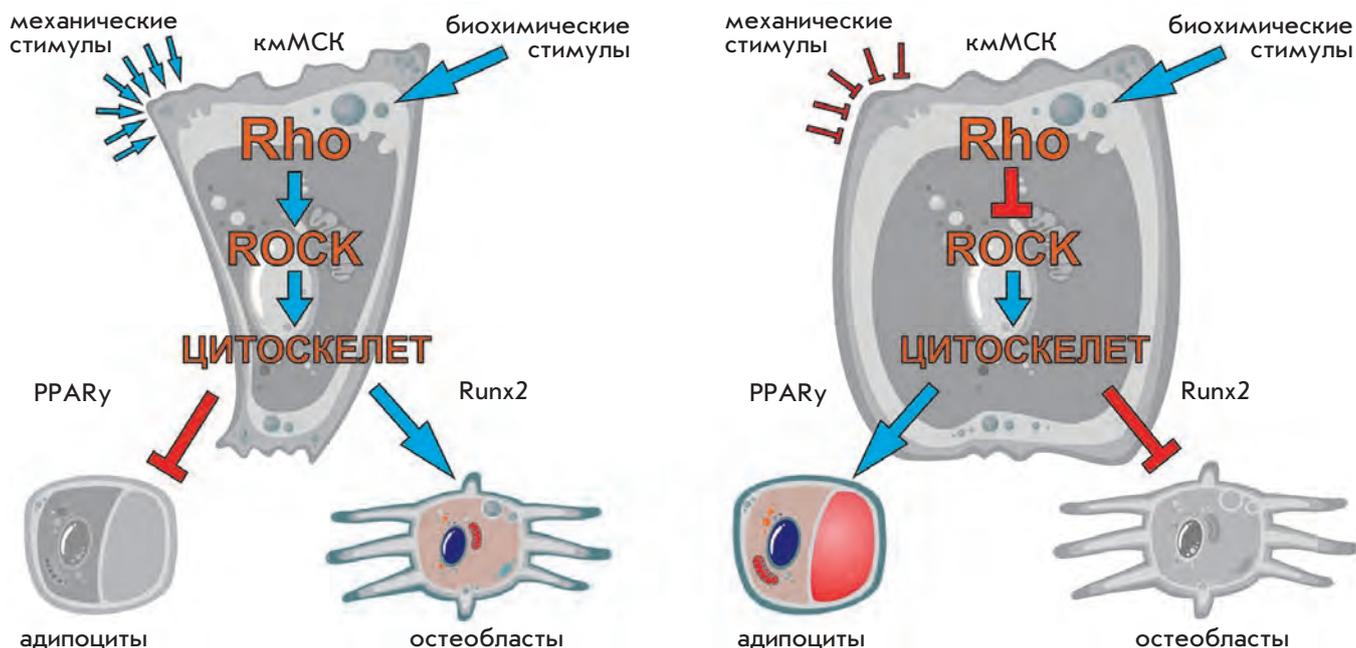
Взаимоисключающее влияние двух направлений коммитирования ММСК может быть связано с наличием и других регуляторных механизмов, в т.ч. аутокринного и паракринного характера. Например, продукты одного из направлений дифференцировки могут ингибировать выработку веществ, необходимых для развития другого фенотипа. Показано, что вырабатываемая адипоцитами липопротеиновая липаза может связывать сортилин, экспрессия которого индуцируется в процессе остеогенной дифференцировки ММСК, т.к. этот рецепторный белок необходим для нормальной минерализации костного матрикса, при этом сам сортилин может опосредовать эндоцитоз липопротеиновой липазы [85]. Кроме того, установлено, что возрастание адипогенной дифференцировки ММСК, полученных от пациентов, больных остеопорозом, обусловлено аномальным ответом клеток на действие цитокина лептина, который в норме действует как инактиватор PPAR $\gamma$  за счет его фосфорилирования [86].

Функциональная роль большинства цитокинов в регуляции жизнедеятельности ММСК, а также адаптации этих и других остеогенных клеток к условиям микрогравитации изучена лишь в малой степени и требует дальнейших исследований. В последнее время особое внимание исследователей обращено на ИЛ-8. Известно, что экспрессия этого нейтрофил-активирующего фактора регулируется ИЛ-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , а также глюкокортикоидными гормонами. Важно отметить, что ИЛ-8 регулирует экспрессию молекул

клеточной адгезии, а также выброс некоторых ферментов, деградирующих внеклеточный матрикс [87]. Перечисленные свойства ИЛ-8 могут иметь определенное значение в локальных механизмах ремоделирования костной ткани, с помощью которых реализуются некоторые местные клеточные реакции в условиях микрогравитации. Так, в биоптатах костей обезьян *Macaca mulatta*, экспонированных на биоспутнике «Бион-11», была выявлена активация резорбтивных процессов за счет остеокластической резорбции, остеоцитарного остеолитизиса, а также активности нейтрофилов, которые выделяют гидролитические ферменты, включаясь в процесс деструкции минерализованного костного матрикса [88]. Недавно было продемонстрировано, что продукция ИЛ-8 у ММСК возрастает в результате реакции на циклическое механическое растяжение, при этом клетки, культивируемые в остеогенной среде, показывают максимально выраженное повышение продукции ИЛ-8 [89]. Интересно, что многократная активация продукции ИЛ-6 и ИЛ-8 наблюдалась у эндотелиальных клеток в условиях моделирования эффектов микрогравитации с помощью RPM [90]. Показано, что клетки различного уровня коммитированности (ММСК и производные от них остеогенные клетки, а также остеобласты) обладают однотипным характером аутокринных реакций на длительное пребывание в условиях моделирования эффектов микрогравитации, которые выражаются в возрастании продукции ИЛ-8 [91].

#### **РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА В РЕАЛИЗАЦИИ ГРАВИТАЦИОННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ММСК В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИИ**

В последнее время появляется все больше аргументов в пользу того, что в регуляции дифференцировочного потенциала стволовых клеток в зависимости от требований «внешнего механического поля» огромную роль играют структуры цитоскелета клетки, тесно взаимосвязанные с ее поверхностными рецепторами (рис. 3). В то же время изменение формы клеток и внутриклеточной архитектоники цитоскелета является достаточно часто наблюдаемым феноменом у клеток в условиях реальной микрогравитации [22], а также при ее моделировании [26, 46, 92]. Установлено, что изменение морфологических характеристик клеток или модуляция активности семейства Rho-киназ (ГТФ-аз, связанных с актиновым цитоскелетом) приводит к модификации дифференцировочных потенциалов ММСК. В частности, активация Rho-киназы вышестоящей киназой RhoA даже в присутствии инсулиноподобного фактора роста IGF-I способствует активации миогенной дифференцировки ММСК и ингибированию адипогенной [93]. Было высказано предположение, что форма клеток выступает в виде механического стимула и играет существенную роль в выборе пути дифференцировки клеток-предшественников. Показано, что хорошо распластанные клетки лучше дифференцируются в остеогенном направлении, а круглые нераспластанные клетки – в адипогенном, при этом экспрессия доминантно негативной *RhoA* приводит к адипоцитарному пути, а сверхэкспрессия последней, напротив, способствует остеогенному. Авторы полагают, что нормальное актин-миозиновое напряжение необходимо для правильного функционирования Rho-киназ, а также что цитоскелет и связанные с ним регуляторные белки



**Рис. 3.** Модель влияния механических стимулов на выбор пути коммитирования ММСК. Форма клетки выступает в качестве механического стимула, направляя коммитирование ММСК в адипогенном и остеогенном направлении. Распластанные клетки предпочитают дифференцироваться в остеогенном направлении, а нераспластанные более круглые – в адипогенном. При изменении формы клеток активной RhoA достаточно для того, чтобы заменять биохимические стимулы, тогда как эффектор RhoA – ROCK действует независимо от формы клеток. Взаимодействие между формой клеток (механическими сигналами), RhoA-сигнализацией, активностью киназы ROCK и структурой цитоскелета изменяет направление коммитирования ММСК. Блокирование дифференцировки указано красными блокирующими сигналами, активация – синими стрелками

выполняют интегральную функцию регуляции процессов дифференцировки клеток, которые в первую очередь опосредованы механическими сигналами [94]. Интересно, что при культивировании ММСК в условиях моделированной микрогравитации у клеток развиваются изменения актинового цитоскелета, вплоть до полного отсутствия пула фибриллярного актина в клетках после семи суток экспозиции, и значительно снижается активность RhoA-киназы. При этом трансфекция клеток вирусным вектором, конститутивно экспрессирующим *RhoA*, предотвращает описанные изменения цитоскелета и нивелирует развитие адипогенных признаков в клетках [92]. Прямая связь ERK1/2<sup>МАРК</sup> с интегрин-опосредованной сигнализацией и активностью некоторых эффекторных белков цитоскелета была продемонстрирована при выключении одного из компонентов, контролирующих процесс ремоделирования актинового цитоскелета (Rho), что приводит к инактивации MAP-киназного каскада [95].

Изучение всей совокупности факторов, задействованных в выборе пути дифференцировки ММСК, поможет выявить механизмы, которые необходимы для поддержания тонкого баланса между двумя направлениями дифференцировки стволовых клеток, возможное нарушение которого в условиях гипокинезии или микрогравитации

может приводить к таким тяжелым клиническим проявлениям, как остеопения или остеопороз. В заключение следует еще раз отметить, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека, принадлежащие к компартменту низко коммитированных клеток-предшественников взрослого организма, представляют собой клеточную популяцию, которая восприимчива к изменению гравитации. Несмотря на растущее число публикаций о влиянии микрогравитации или моделирования ее эффектов на морфофункциональные характеристики различных типов культивируемых остеогенных клеток, точные молекулярные и внутриклеточные механизмы наблюдаемых эффектов до сих пор остаются не до конца ясными. Вместе с тем феноменология реакций остеогенных клеток различного уровня коммитированности указывает на существование единых механизмов восприятия и ответной реакции клеток на измененное гравитационное поле. Дальнейшие комплексные исследования в этом направлении позволят расширить фундаментальные представления о механизмах гравитационной и механической чувствительности клеток-предшественников взрослого организма и их возможной вовлеченности в развитие локальных клеточных реакций, развивающихся в костной системе в условиях микрогравитации. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Григорьев А.И., Егоров А.Д. Длительные космические полеты. // Космическая биология и медицина. Человек в космическом полете. М.: Наука, 1994. Т. 3. Кн. 2. 549 с.
- Оганов В.С. Костная система, невесомость и остеопороз. // М.: Слово, 2003. 260 с.
- Akiyama H., Kanai S., Hirano M. et al. Expression of PDGF-beta receptor, EGF receptor, and receptor adaptor protein Shc in rat osteoblasts during spaceflight // *Mol. Cell Biochem.* 1999. Vol. 202. № 1-2. P. 63-71.
- Carmeliet G., Nys G., Bouillon R. Microgravity reduces the differentiation of human osteoblastic MG-63 cells // *J. Bone Miner. Res.* 1997. Vol. 12. № 5. P. 786-794.
- Hughes-Fulford M. Physiological effects of microgravity on osteoblast morphology and cell biology // *Cell biology and biotechnology in space* Ed. by A. Cogoli. *Advances in space biology and medicine*, 2002. Vol. 8. P. 129-57.
- Hughes-Fulford M., Rodenacker K., Jütting U. Reduction of anabolic signals and alteration of osteoblast nuclear morphology in microgravity // *J. Cell. Biochem.* 2006. Vol. 99. № 2. P. 435-449.
- Kumei Y., Morita S., Katano H. et al. Microgravity signal ensnarls cell adhesion, cytoskeleton, and matrix proteins of rat osteoblasts: osteopontin, CD44, osteonectin, and alpha-tubulin // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. Vol. 1090. P. 311-317.
- Kumei Y., Shimokawa H., Ohya K. et al. Small GTPase Ras and Rho expression in rat osteoblasts during spaceflight // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007. Vol. 1095. P. 292-299.
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // *Stem Cells.* 2001. Vol. 19. № 3. P. 180-192.
- Crisan M., Yap S., Castella L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs // *Cell Stem Cell.* 2008. Vol. 3. № 3. P. 301-313.
- Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D. et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells // *J. Biomed. Sci.* 2003. Vol. 10. № 2. P. 228-241.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* 1999. Vol. 284. № 5411. P. 143-147.
- Wagner W., Roderburg C., Wein F. et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors // *Stem Cells.* 2007. Vol. 25. № 10. P. 2638-2647.
- Burger E.H., Klein-Nulend J. Microgravity and bone cell mechanosensitivity // *Bone.* 1998. Vol. 22. № 5 (Suppl). P. 127S-130S.
- Mikuni-Takagaki Y., Suzuki Y., Kawase T., Saito S. Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress // *Endocrinology.* 1996. Vol. 137. № 5. P. 2028-2035.
- Парфенов Г.П. Невесомость и элементарные биологические процессы // *Проблемы космической биологии / Под ред. акад. А.М. Уголева. Л.: Наука, 1988. Т. 57. С. 66-77.*
- Тайрбеков М.Г. Вероятные механизмы гравитационной чувствительности клеток // *Доклады академии наук.* 2000. Т. 375. № 1. С. 121-124.
- Lambert C.A., Lapiere C.M., Nusgens B.V. Biology of adherent cells in microgravity // *The gravity environment in space flight. Biology in Space and life on Earth. Effects of spaceflight on biological systems.* Ed. by E. Brinckmann. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2007. P. 123-155.
- Moore D., Cogoli A. Gravitational and space biology at the cellular level // *Biological and medical research in space. An overview of life sciences research in microgravity* Ed. by D. Moore, A. Cogoli, H. Oser. Hamburg: Springer, 1996. P. 1-107.
- Van Loon J.J.W.A. The gravity environment in space flight // *Biology in Space and life on Earth. Effects of spaceflight on biological systems.* Ed. by E. Brinckmann. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2007. P. 17-32.
- Буравкова Л.Б. Проблемы гравитационной биологии клетки // *Авиакосмическая и экологическая медицина.* 2008. Т. 42. № 6. С. 10-18.
- Lewis M. The cytoskeleton, apoptosis and gene expression in T-lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity // *Cell biology and biotechnology in space* Ed. by A. Cogoli. *Advances in space biology and medicine*, 2002. Vol. 8. P. 77-128.
- Ingber D.E. Mechanosensation through integrins: cells act locally but think globally // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003. Vol. 100. № 4. P. 147-1474.
- Ingber D.E. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology // *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116. Pt 7. P.1157-1173.
- Albrecht-Buehler G. Possible mechanisms of indirect gravity sensing by cells // *ASGSB Bull.* 1991. Vol. 4. № 2. P. 25-34.
- Wang Y., McNamara L.M., Schaffler M.B., Weinbaum S. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007. Vol. 104. № 40. P. 15941-15946.
- Ajubi N.E., Klein-Nulend J., Alblas M.J. et al. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 276. № 1. P. E171-E178.
- Pitsillides A.A., Rawlinson S.C., Suswillo R.F. et al. Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? // *FASEB J.* 1995. Vol. 9. № 15. P. 1614-1622.
- McGarry J.G., Klein-Nulend J., Mullender M.G., Prendergast P.J. A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses - a computational and experimental study // *FASEB J.* 2005. Vol. 19. № 3. P. 482-484.
- Smalt R., Mitchell F.T., Howard R.L., Chambers T.J. Induction of NO and prostaglandin E in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1997. № 273. P. 751-758.
- Searby N.D., Steele C.R., Globus R.K. Influence of increased mechanical loading by hypergravity on the microtubule cytoskeleton and prostaglandin E2 release in primary osteoblasts // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005. Vol. 289. № 1. C148-158.
- Arikawa T., Omura K., Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells // *J. Cell Physiol.* 2004. Vol. 200. № 3. P. 400-406.
- Kurpinski K., Chu J., Hashi C., Li S. Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006. Vol. 103. № 44. P. 16095-16100.
- Rucci N., Migliaccio S., Zani B.M. et al. Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-approved Rotating Wall Vessel bioreactor (RWV) // *J. Cell. Biochem.* 2002. Vol. 85. № 1. P. 167-179.
- Sato A., Hamazaki T., Oomura T. et al. Effects of microgravity on c-fos gene expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells // *Adv. Space Res.* 1999. Vol. 24. № 6. P. 807-813.
- Pardo S.J., Patel M.J., Sykes M.C. et al. Simulated microgravity using the Random Positioning Machine inhibits differentiation and alters gene expression profiles of 2T3 preosteoblasts // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005. Vol. 288. № 6. P. C1211-1221.
- Zayzafoon M., Gathings W.E., McDonald J.M. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis // *Endocrinology.* 2004. Vol. 145. № 5. P. 2421-2432.
- Dai Z.Q., Wang R., Ling S.K. et al. Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells // *Cell Prolif.* 2007. Vol. 40. № 5. P. 671-684.
- Yuge L., Kajiume T., Tahara H. et al. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation // *Stem Cells Dev.* 2006. Vol. 15. № 6. P. 921-929.
- Boonstra J. Growth factor-induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity // *FASEB J.* 1999. Vol. 13. (Suppl). P. S35-42.
- Jaiswal R.K., Jaiswal N., Bruder S.P. et al. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. № 13. P. 9645-9652.
- Celil A.B., Campbell P.G. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Ox) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. № 36. P. 31353-31359.
- Riddle R.C., Taylor A.F., Genetos D.C., Donahue H.J. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006. Vol. 290. № 3. P. C776-784.
- Conget P.A., Minguell J.J. Phenotypal and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells // *J. Cell. Physiol.* 1999. Vol. 181. № 1. P. 67-73.
- Buravkova L.B., Merzlikina N.V., Romanov Y.A., Buravkov S.V. Influence of long-term gravity vector changes on human mesenchymal stem cells in vitro // *J. Grav. Physiol.* 2005. Vol. 12. № 1. P. 241-242.
- Гершович П.М., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б. Цитоскелет и адгезия культивируемых стромальных клеток-предшественников костного мозга человека при моделировании эффектов микрогравитации. *Цитология.* 2009. Т. 51. № 11. С. 896-903.
- Miyamoto S., Teramoto H., Coso O.A. et al. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules // *J. Cell Biol.* 1995. Vol. 131. № 3. P. 791-805.
- Iwaniec U.T., Wronski T.J., Amblard D. et al. Effects of disrupted beta1-integrin function on the skeletal response to short-term hindlimb unloading in mice // *J. Appl. Physiol.* 2005. Vol. 98. № 2. P. 690-696.
- Meyers V.E., Zayzafoon M., Gonda S.R. et al. Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells // *J. Cell Biochem.* 2004. Vol. 93. № 4. P. 697-707.
- You J., Reilly G.C., Zhen X. et al. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. № 16. P. 13365-13371.
- Ishijima M., Tsuji K., Ritling S.R. et al. Osteopontin is required for mechanical stress-dependent signals to bone marrow cells // *J. Endocrinol.* 2007. Vol. 193. № 2. P. 235-243.
- Ohno S., Im H.J., Knudson C.B., Knudson W. Hyaluronan oligosaccharides induce matrix metalloproteinase 13 via transcriptional activation of NFkappaB and p38 MAP kinase in articular chondrocytes // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. № 26. P. 17952-17960.
- Kasper G., Glaeser J.D., Geissler S. et al. Matrix metalloproteinase activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior // *Stem Cells.* 2007. Vol. 25. № 8. P. 1985-1994.
- Gebken J., Lüders B., Notbohm H. et al. Hypergravity stimulates collagen synthesis in human osteoblast-like cells: evidence for the involvement of p44/42 MAP-kinases (ERK 1/2) // *J. Biochem.* 1999. Vol. 126. № 4. P. 676-682.
- Narayanan R., Smith C.L., Weigel N.L. Vector-averaged gravity-induced changes in cell signaling and vitamin D receptor activity in MG-63 cells are reversed by a 1,25-(OH)2D3 analog, EB1089 // *Bone.* 2002. Vol. 31. № 3. P. 381-388.
- Гершович Ю.Г., Гершович П.М., Буравкова Л.Б. Влияние клинотатирования на культивируемые мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека // *Технологии живых систем.* 2009. № 2. С. 3-9.
- Stein G.S., Lian J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype // *Endocr. Rev.* 1993. Vol. 14. № 4. P. 424-442.
- Yuge L., Hide I., Kumagai T. et al. Cell differentiation and p38(MAPK) cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2003. Vol. 39. № 1-2. P. 89-97.
- Sugawara Y., Suzuki K., Koshikawa M. et al. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells // *Jpn. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 88. № 3. P. 262-269.
- Nauman E.A., Satcher R.L., Keaveny T.M. et al. Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with short-term increases in PGE(2) but no change in mineralization //

- J. Appl Physiol. 2001. Vol. 90. № 5. P. 1849–1854.
61. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Марин Ю.Б. Гипотеза о роли клеток остеогенного ряда в формировании стабильной морфологической структуры минералов костного матрикса // *Морфология*. 2002. Т. 122. № 6. С. 74–77.
  62. Lee K-S, Kim H-J, Li Q-L et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor  $\beta$ 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between runx2 and smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12 // *Mol. and Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. № 23. P. 8783–8792.
  63. Ducey P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance // *Science*. 2000. Vol. 289. № 5484. P. 1501–1504.
  64. Lee M-H, Kim Y-H, Kim H-J et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. № 36. P. 34387–34394.
  65. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1 // *Endocr. Rev.* 2000. Vol. 21. № 4. P. 393–411.
  66. Rath B, Nam J, Knobloch T.J et al. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts // *J. Biomech.* 2008. Vol. 41. № 5. P. 1095–1103.
  67. Capulli M, Rufo A, Teti A, and Rucci N. Global transcriptome analysis in mouse calvarial osteoblasts highlights sets of genes regulated by modeled microgravity and identifies a “Mechanoresponsive osteoblast gene signature” // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009. Vol. 10. P. 240–252.
  68. Patel M.J., Chang K.H., Sykes M.C. et al. Low magnitude and high frequency mechanical loading prevents decreased bone formation responses of 2T3 preosteoblasts // *J. Cell Biochem*. 2009. Vol. 106. № 2. P. 306–316.
  69. Salingcarboriboon R, Tsuji K, Komori T et al. Runx2 is a target of mechanical unloading to alter osteoblastic activity and bone formation in vivo // *Endocrinology*. 2006. Vol. 147. № 5. P. 2296–2305.
  70. Shockley K.R., Rosen C.J., Churchill G.A., Lecka-Czernik B. PPAR $\gamma$ 2 regulates a molecular signature of marrow mesenchymal stem cells // *PPAR Res.* 2007. Vol. 2007. P. 81219.
  71. Lecka-Czernik B, Moerman E.J., Grant D.F. et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation // *Endocrinology*. 2002. Vol. 143. № 6. P. 2376–2384.
  72. Ali A.A., Weinstein R.S., Stewart S.A. et al. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation // *Endocrinology*. 2005. Vol. 146. № 3. P. 1226–1235.
  73. Lazarenko O.P., Rzonca S.O., Hogue W.R. et al. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone // *Endocrinology*. 2007. Vol. 148. № 6. P. 2669–2680.
  74. Moerman E.J., Teng K., Lipschitz D.A., Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- $\gamma$ 2 transcription factor and TGF- $\beta$ /BMP signaling pathways // *Aging Cell*. 2004. Vol. 3. № 6. P. 379–389.
  75. Estes B.T., Gimble J.M., Guilak F. Mechanical signals as regulators of stem cell fate // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2004. № 60. P. 91–126.
  76. David V., Martin A., Lafage-Proust M.H. et al. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis // *Endocrinology*. 2007. Vol. 148. № 5. P. 2553–2562.
  77. Cheng S.L., Shao J.S., Charlton-Kachigian N. et al. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. № 46. P. 45969–45977.
  78. Kang S., Bennett C.N., Gerin I. et al. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. № 19. P. 14515–14524.
  79. Armstrong V.J., Muzylak M., Sinters A. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor  $\alpha$  // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. № 28. P. 20715–20727.
  80. Sen B., Xie Z., Case N. et al. Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable  $\beta$ -catenin signal // *Endocrinology*. 2008. Vol. 149. № 12. P. 6065–6075.
  81. Pan Z., Yang J., Guo C. et al. Effects of hindlimb unloading on ex vivo growth and osteogenic/adipogenic potentials of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in rats // *Stem Cells Dev.* 2008. Vol. 17. № 4. P. 795–804.
  82. Boutahar N., Guignandon A., Vico L., Lafage-Proust M.H. Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. № 29. P. 30588–30599.
  83. Salasznyk R.M., Klees R.F., Williams W.A. et al. Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // *Exp. Cell Res.* 2007. Vol. 313. № 1. P. 22–37.
  84. Xiao G., Jiang D., Thomas P. et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1 // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. № 6. P. 4453–4459.
  85. Maeda S., Nobukuni T., Shimo-Onoda K. et al. Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization // *J. Cell Physiol.* 2002. Vol. 193. № 1. P. 73–79.
  86. Astudillo P., Ríos S., Pastenes L. et al. Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action // *J. Cell Biochem*. 2008. Vol. 103. № 4. P. 1054–1065.
  87. Chaudhary L.R., Avioli L.V. Regulation of interleukin-8 gene expression by interleukin-1 $\beta$ , osteotropic hormones, and protein kinase inhibitors in normal human bone marrow stromal cells // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. № 28. P. 16591–16596.
  88. Родионова Н.В., Оганов В.С. Цитологические механизмы развития остеопороза при действии факторов космического полета // *Проблемы остеологии*. 2001. Т. 4. № 1–2. С. 135–136.
  89. Sumanasinghe R.D., Pfeiler T.W., Monteiro-Riviere N.A., Lobo E.G. Expression of proinflammatory cytokines by human mesenchymal stem cells in response to cyclic tensile strain // *J. Cell Physiol.* 2009. Vol. 219. № 1. P. 77–83.
  90. Ulbrich C., Westphal K., Baatout S. et al. Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity // *J. Cell. Biochem*. 2008. Vol. 104. № 4. P. 1324–1341.
  91. Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б. Продукция интерлейкинов в культуре мезенхимальных стромальных клеток человека при моделировании эффектов микрогравитации. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2009. № 3. С. 44–50.
  92. Meyers V.E., Zayzafoon M., Douglas J.T., McDonald J.M. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity // *J. Bone Miner. Res.* 2005. Vol. 20. № 10. P. 1858–1866.
  93. Sordella R., Jiang W., Chen G.C. et al. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis // *Cell*. 2003. Vol. 113. № 2. P. 147–158.
  94. McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M. et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Dev. Cell*. 2004. Vol. 6. № 4. P. 483–495.
  95. Renshaw M.W., Toksoz D., Schwartz M.A. Involvement of the small GTPase Rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. № 36. P. 21691–21694.