

УДК 616.832-018:577.21]:616-089.843

**Молекулярно-генетическая характеристика и поверхностный фенотип культуры мезенхимальных стволовых клеток, пригодных для трансплантации**

*А.Н. Кондрачук, Д.Р. Петренев, Н.Н. Рубаник,  
Е.В. Воропаев*

**Рубрики: 34.15.23; 76.35.33**

*НИР:* «Разработать и внедрить клеточные технологии для оптимизации репаративных процессов поврежденного железистого эпителия и сосудистых компонентов органов».

*Сроки выполнения НИР:* январь 2011 г. — декабрь 2013 г.

*Научный руководитель:* д-р мед. наук, проф. А.Н. Лызиков.

*Источник финансирования:* госбюджет.

*Цель* — изучение динамики экспрессии поверхностных антигенов и экспрессии генов, маркерных для культуры мезенхимальных стволовых клеток. Охарактеризовать морфофункциональные свойства мезенхимальных стволовых клеток выделенных из жировой ткани и костного мозга лабораторных животных.

С развитием клеточных технологий все большее число исследователей занимается вопросами биологии, культивирования, экспериментального и клинического применения постнатальных стволовых клеток. При этом ключевую позицию занимают исследования мезенхимальных стволовых клеток (МСК), что обусловлено доступностью методик их получения, экспансии *in vitro* и наличием ряда специфических полезных свойств. Анализ МСК различного тканевого происхождения имеет немаловажное теоретическое и практическое значение. С фундаментальной точки зрения важно понимать, имеются ли какие-либо специфические отличия МСК в зависимости от их локализации в тех или иных тканевых нишах и их принадлежности к развивающимся или зрелым, дефинитивным тканям (плацента, костный мозг и жировая ткань взрослого организма). Результаты сравнительных исследований различных типов МСК могут иметь и практическую ценность, например, для оптимизации технологий трансплантации МСК. Очевидно, что эффективность лечения с использованием МСК во многом будет определяться их биологической активностью, которая, в свою очередь, может непосредственно зависеть от таких факторов, как источник их получения и особенности экспансии *in vitro*. В клинической практике наиболее безопасным считается использование аутологичного клеточного материала. Однако использование МСК в целях аутооттрансплантации диктует необходимость предварительной оценки их морфофункционального состояния и фенотипических характеристик для подтверждения адекватности трансплантируемого материала.

Для получения культуры МСК использовались лабораторные мыши линии С57В1/6, 6-8-недельного возраста, массой  $20 \pm 5$  г. Для фенотипической характеристики полученных культур МСК использовали следующую панель моноклональных антител: CD11b FITC (маркер моноцитов/макрофагов),

CD44 PE (рецептор гиалуроната и остеопонтин), CD45 FITC (панлейкоцитарный маркер), CD90.2 FITC (Thy1, маркер дифференцировки тимоцитов, пан-Т-клеточный маркер), CD105 PE (эндоглин), CD117(c-kit) PE, Anti-Sca-1 FITC. В анализ брали прилипающую фракцию клеток красного костного мозга после 1, 10 и 21 дней субкультивирования. На начальных этапах субкультивирования преобладали гемопоэтические клетки, неэкспрессирующие маркер Sca-1. К 10 сут культивирования доля Sca-1 позитивных клеток возросла до 15%, а на 21 сут до 52%. Таким образом, в культуре наблюдалась смена субпопуляционного состава за счет преимущественного деления МСК и элиминации гемопоэтических клеток. Отдельно следует отметить тот факт, что интенсивность свечения Sca-1 позитивных клеток значительно снижалась в 10 и 21-суточных культурах, что может свидетельствовать об уменьшении плотности рецепторов Sca-1 на поверхности клеток в эти сроки. Одной из проблем при анализе данных методом проточной цитометрии было наличие в клеточной популяции элементов с высокой аутофлуоресценцией, что затрудняло выявление специфического сигнала по каналам FL1 (Sca-1) и FL2 (CD44). Эти клетки были исключены из анализа по показателю бокового светорассеивания, что позволило произвести анализ уровня экспрессии рецептора CD44. В дальнейшем была произведена оптимизация протокола проточного флуоресцентного анализа для снижения уровня аутофлуоресценции элементов клеточных суспензий.

Методом ПЦР в реальном времени с применением интеркалирующего красителя Sybr Green, по соответствующему протоколу был проведен анализ уровней экспрессии генов, которые являются важными для популяционной идентификации МСК и направления их дифференцировки. Были определены уровни экспрессии следующих генов, необходимых для характеристики культуры МСК: Lyba (Sca-1), Pecam (CD31), Ptpcr (CD45), Cd34, Prominin (CD133), Cd44, Acan (aggrecan). Результаты были нормализованные по  $\beta$ -actin, GAPDH и уровню экспрессии ( $\Delta Ct$ ). Полученные результаты подтверждают выявленные ранее методом проточной цитометрии данные о снижении уровня экспрессии гена Sca-1 в общей популяции культивируемых клеток на 10 и 21 сут. Также отмечено увеличение уровня экспрессии CD44 в общей популяции клеток. Этот эффект, очевидно, связан с увеличением доли CD44+ клеток с 6% на 1 сут до 16 и 52% на 10 и 21 сут культивирования соответственно. При этом плотность поверхностного антигена CD44 на клетках была снижена в этот период по сравнению с клетками после 1 сут инкубирования. Увеличение экспрессии генов CD133 и CD45 в общей популяции клеток свидетельствует о том, что на протяжении всего срока культивирования в культуре присутствуют гемопоэтические клетки. Нарастающая динамика экспрессии этих генов может свидетельствовать о формировании очагов кроветворения *in vitro*. Это предположение подтверждается тем фактом, что снижение экспрессии генов, кодирующих рецепторы CD34, наблюдавшееся на 10 сут, постепенно возвращается к норме (1 сут) к 21 сут. Динамика уровня экспрессии гена Pecam

свидетельствует о снижении примеси эндотелиальных клеток и зрелых клеток гемопоэтического ростка. В то же время появление экспрессии гена *Asan* на 10 сут культивирования может свидетельствовать о начальной стадии хондрогенной дифференцировки отдельных клеток. Таким образом, при отсутствии факторов среды, влияющих на путь дифференцировки МСК, может происходить спонтанный выбор фенотипа, по крайней мере, частью клеток.

Методом проточной цитометрии установлено, что количество клеток Sca-1+, CD44+ возрастает с 6 до 52% в течение срока культивирования (21 сут), при этом интенсивность флуоресцентного свечения указанных поверхностных антигенов снижается, что согласуется с данными экспрессии аналогичных генов, полученными с помощью ПЦР в реальном времени. На протяжении всего срока культивирования присутствует значительное количество гемопоэтических клеток различных субпопуляций (CD133 и CD45), что подтверждается результатами иммунофенотипирования и определения экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени. Показана значительная гетерогенность и направленность к дифференцировке клеточного состава полученных культур.

*Область применения:* молекулярная и клеточная биология, трансплантология, регенеративная медицина.

*Рекомендации по использованию:* полученные результаты могут применяться в практике научных исследований в лабораториях, занимающихся культуральными клеточными технологиями.

*Предложения по сотрудничеству:* совместные исследования в области разработки и применения клеточных технологий в трансплантологии.

### **Molecular-genetic characteristics and the surface phenotype of mesenchymal stem cell culture suitable for transplantation**

*A.N. Kondrachuk, D.R. Petrenyov, N.N. Rubanik,*

*Y.V. Voropaev* The use of autologous MSCs as a transplant requires a preliminary assessment of the morphological-functional and phenotypic characteristics to confirm the adequacy of the transplanted material. The aim of the study was to analyze the dynamics of expression of surface antigens and corresponding genes in mesenchymal stem cells culture and to analyze the morphological properties of mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue and bone marrow of laboratory animals.

Flow cytometry results revealed that the number of cells of Sca-1+, CD44+ increased from 6 to 52% during the period of cultivation (21 days). As demonstrated by immunophenotyping and determination of gene expression by real-time PCR, there was a significant amount of contaminant subpopulations (CD133 and CD45) of hematopoietic cells throughout the cell culture period. There was shown the considerable heterogeneity and cellular commitment to differentiate the obtained cultures.

*Field of application:* molecular and cell biology, transplantology, regenerative medicine.

*Offers for cooperation:* joint research in the field of cell therapy technologies in transplantology.