

На правах рукописи

ПАЮШИНА Ольга Викторовна

**МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И
ДЕФИНИТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ: ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ**

Специальность – 03.03.04. Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва - 2015

Работа выполнена в лаборатории клеточных и молекулярных основ гистогенеза
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт
биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Научный консультант:

доктор биологических наук
ДОМАРАЦКАЯ Елена Ивановна,
ФБГУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
заведующая лабораторией клеточных и молекулярных основ гистогенеза

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
ГОЛЬДШТЕЙН Дмитрий Вадимович,
ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН,
заведующий лабораторией генетики стволовых клеток

доктор биологических наук
САБУРИНА Ирина Николаевна,
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»,
заведующая лабораторией клеточной биологии и патологии развития

доктор медицинских наук
ЧАЙЛАХЯН Рубен Карпович,
ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ,
заведующий лабораторией стромальной регуляции иммунитета

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Государственный научный
центр Российской Федерации - Институт медико-
биологических проблем Российской академии наук

Защита состоится 17 ноября 2015 г. в 15 часов 30 минут на заседании
диссертационного совета Д.501.001.52 при Московском государственном
университете имени М.В.Ломоносова по адресу 119234, Москва, Ленинские
горы, д.1, стр.12, Биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского
государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте
<http://www.bio.msu.ru/dissertations/view.php?ID=691>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук
Калистратова Е.Н.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследование мезенхимных стромальных клеток (МСК) – мультипотентных стволовых и родоначальных клеток, способных к дифференцировке в различные типы соединительной ткани – является одним из приоритетных направлений современной биологии, высоко актуальным с точки зрения фундаментальной науки и медицинской практики. МСК служат прекрасной моделью для изучения важнейших проблем клеточной биологии и биологии развития, таких как механизмы гистогенеза и регенерации тканей, пути регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки, а также считаются перспективным ресурсом для бурно развивающейся в последнее время регенеративной медицины.

Основы экспериментального изучения МСК были заложены в 60-х гг. XX века А.Я. Фриденштейном, выявившим их в строме костного мозга, селезенки и тимуса как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф) (Фриденштейн и др., 1970; Friedensteyn et al., 1976). В настоящее время для идентификации мультипотентных МСК рекомендованы следующие критерии: 1) адгезивность к пластику; 2) наличие поверхностных антигенов CD73, CD90 и CD105 при отсутствии кроветворных маркеров; 3) способность к остео-, адипо- и хондрогенезу *in vitro* (Dominici et al., 2006). С 90-ых годов XX века в мировой науке отмечается повышенный интерес к МСК, связанный как с возросшим осознанием роли стволовых клеток в формировании и поддержании стабильного функционирования тканей, так и с началом использования МСК в клинике. В настоящее время в исследовании МСК достигнут значительный прогресс, однако многие вопросы их биологии остаются неизученными.

Клетки с характеристиками МСК обнаружены в большинстве тканей и органов как развивающегося, так и зрелого организма (da Silva Meirelles et al., 2006; Covas et al., 2008). В различных органах они в целом сходны по морфологии, иммунофенотипу и широте потенциала к дифференцировке, но в ряде случаев различаются экспрессией некоторых маркеров или выраженностью тех или иных потенциалов (Sági et al., 2012; Signore et al., 2012). Гистогенетические взаимоотношения между популяциями МСК различной органной принадлежности не вполне ясны: неизвестно, образуются они в различных тканях независимо или же происходят из общего источника, впоследствии расселяясь по организму. С этой точки зрения особый интерес приобретает сравнительное исследование МСК из кроветворных органов на разных стадиях онтогенеза. В этих органах МСК играют ключевую роль в поддержании гемопозза, привлекая кроветворные клетки за счет продукции хемоаттрактантов, регулируя их пролиферацию и дифференцировку путем контактных взаимодействий и секреции цитокинов, а также дифференцируясь в более специализированные элементы кроветворной стромы (Majumdar et al., 1998; Wagner et al., 2007). В ходе онтогенеза кроветворение неоднократно меняет локализацию, последовательно перемещаясь из желточного мешка и аорто-гонадо-мезонефральной области в печень, селезенку и костный мозг. Есть основания предполагать, что при этом мигрируют и МСК, подготавливая

«ложе» для приходящих вслед за ними кроветворных клеток (Van Den Heuvel et al., 1987; Wolf et al., 1995). Существование миграционного потока МСК, последовательно заселяющих кроветворные органы, может означать гистогенетическое единство популяции этих клеток вне зависимости от их локализации. В этом случае сравнение свойств МСК из транзиторных и дефинитивных органов гемопоэза способно прояснить вопрос об изменениях, претерпеваемых ими и организуемой ими кроветворной нишей в ходе развития.

Однако систематических исследований подобного рода не проводилось. В отличие от детально охарактеризованных клеток зрелого костного мозга, МСК из других кроветворных органов изучены относительно слабо. В частности, о МСК зародышевой печени – основного органа гемопоэза на протяжении значительной части пренатального развития – известно, что они превосходят клетки костного мозга по способности к пролиферации, уступая им по остео- и адипогенным потенциям (Ryden et al., 2003; Guillot et al., 2007; Fromigue et al., 2008), но данных о зависимости их свойств от стадии онтогенеза практически нет. Мало работ посвящено МСК из селезенки (in't Anker et al., 2003; da Silva Meirelles et al., 2006; Hegyi et al., 2010), интересной тем, что в ходе развития миелопоэз в ней сменяется лимфопоэзом, что, очевидно, требует изменений в организуемом МСК микроокружении. Скудны и данные о МСК, содержащихся в зачатке костного мозга в конце пренатального периода, до начала активного костномозгового кроветворения (Hu et al., 2002; Guillot et al., 2008; Zhang et al., 2009). Наша работа призвана восполнить пробелы в знаниях о МСК костного мозга, печени и селезенки на стадиях развития, соответствующих неодинаковой активности гемопоэза в этих органах.

В рамках проблемы формирования популяции МСК в индивидуальном развитии несомненный интерес представляет характеристика их микроокружения в различных кроветворных органах. Новую информацию о тканевых нишах МСК может дать детальное изучение гетерогенного клеточного состава культур, полученных из соответствующих органов, а также исследование взаимодействий МСК с компонентами внеклеточного матрикса. Имеющиеся данные о влиянии матриксных белков на прикрепление, рост и дифференцировку МСК неоднозначны; кроме того, остается неизвестным, одинаковым ли образом отвечают на сигналы от внеклеточного матрикса стромальные предшественники из разных органов и меняется ли их способность к адгезивным взаимодействиям с его компонентами в ходе онтогенеза.

Еще одна недостаточно изученная проблема – установление иерархической структуры гетерогенной популяции МСК. Одним из подходов к ее анализу может служить применение цитотоксических препаратов, избирательно поражающих клетки той или иной степени зрелости, в частности, 5-фторурацила (5-ФУ). В кроветворном диффероне он удаляет более зрелые предшественники, не действуя на примитивные клетки с высокой способностью к самоподдержанию (van Zant, 1984). Имеются основания предполагать, что и в гистогенетическом ряду МСК он селективно элиминирует клетки, более продвинутые в дифференцировке (Minguell et al., 2000), однако

его действие на стромальные клетки нуждается в дополнительном исследовании.

Следует также отметить относительную малоизученность особенностей функционирования МСК *in vivo*, делающую актуальным анализ их поведения после трансплантации реципиенту. Для этой цели разработаны различные экспериментальные модели, в том числе трансплантация МСК в составе тканевых фрагментов (Tavassoli, 1984; Schofield, 1986), в диффузионных камерах (Ashton et al. 1980; Friedenstein et al., 1987) и на пористых носителях из различных натуральных или синтетических материалов, могущих стать основой для тканеинженерных конструкций (Dennis et al., 1992; Aung et al., 2002; Graziano et al., 2008). Данные, которые могут быть получены с помощью этих моделей – в частности, о взаимодействии трансплантированных МСК с организмом реципиента и регуляции их дифференцировки тканевым микроокружением – необходимы не только для лучшего понимания биологии МСК, но и для их эффективного и безопасного применения в медицине.

Цель и задачи исследования. Основная цель работы состояла в выявлении органотипических особенностей популяций МСК как клеток, организующих кроветворное микроокружение, в различных органах транзитного и дефинитивного гемопоэза, и анализе динамики изменения их характеристик в ходе индивидуального развития.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить содержание клеток с характеристиками МСК в строме костного мозга, печени и селезенки половозрелых животных и зародышей; проанализировать зависимость эффективности их клонирования, антигенного фенотипа, морфологии и клеточного состава образуемых ими колоний от органной принадлежности и стадии онтогенеза.

2. Проанализировать клеточный состав стромы зародышевой печени, дать фенотипическую характеристику различных типов клеток, содержащихся в ее культуре.

3. Охарактеризовать рост МСК из костного мозга, печени и селезенки развивающегося и зрелого организма при последовательном субкультивировании, проанализировав их пролиферативную активность, морфологические и фенотипические изменения по мере пассирования.

4. Провести сравнительный анализ потенциалов МСК из исследуемых источников к дифференцировке в различных направлениях.

5. Оценить влияние условий микроокружения на реализацию потенциалов МСК зрелого костного мозга и печени зародышей к дифференцировке *in vivo*.

6. Проанализировать чувствительность МСК костного мозга и зародышевой печени к цитотоксическому действию 5-ФУ и сравнить потенциалы субпопуляций МСК, различающихся по устойчивости к нему.

7. Исследовать влияние адгезивных взаимодействий МСК с различными компонентами внеклеточного матрикса на их клональный рост и дифференцировку *in vitro*.

Научная новизна исследования. Впервые проведено комплексное сравнительное исследование популяций МСК костного мозга, печени и

селезенки крысы на разных стадиях онтогенеза. Показано, что, несмотря на сходство стромальных клеток изученных органов по морфологии и способности к клональному росту, их фенотипические характеристики и выраженность потенций к основным дифференцировкам зависят от органной принадлежности и стадии развития.

Получены новые данные о свойствах субпопуляций МСК, устойчивых к цитотоксическому действию 5-ФУ. Показано, что эти клетки быстрее чувствительных к 5-ФУ прекращают активную пролиферацию, что может указывать на содержание среди них более зрелых клеток. Выявлены различия в характеристиках резистентных к 5-ФУ МСК между костным мозгом половозрелых крыс и печенью зародышей, касающиеся степени сохранения остеогенных потенций в ходе пассирования и могущие отражать неодинаковую структуру популяций стромальных клеток в сравниваемых органах.

В экспериментах по анализу влияния белков внеклеточного матрикса на дифференцировку МСК костного мозга впервые показано ингибирование онтогенеза при их культивировании на фибронектине и идентифицирован участок молекулы фибронектина, ответственный за этот эффект.

Впервые оценены потенции МСК из печени зародышей крысы к дифференцировке *in vivo* при трансплантации в диффузионных камерах и показано, что образование костной ткани происходит лишь в редких случаях при помещении в диффузионную камеру суспензии свежевыделенных клеток.

Протестирована потенциальная пригодность ряда натуральных и синтетических материалов, включая биоматериалы на основе костного матрикса «Остеопласт-М» и «Остеопласт-Т», а также различные модификации криогелей на основе агарозы или диметилакриламида, к применению в качестве носителей для культивирования и трансплантации МСК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенной оценки относительного содержания МСК в кроветворных органах и анализа особенностей этих клеток в зависимости от локализации и стадии развития углубляют понимание изменений популяции МСК в ходе онтогенеза, расширяют представления о формировании кроветворной системы и закономерностях функционирования МСК как представителей когорты стволовых клеток в пре- и постнатальном развитии. На их основании выдвинута концепция созревания популяции МСК, происходящего в онтогенезе параллельно с созреванием стволовых кроветворных клеток и приводящего к изменению качества кроветворной ниши. Факты, выявленные при анализе роста и дифференцировки МСК на компонентах внеклеточного матрикса и в организме животных-реципиентов, имеют существенное значение для понимания регуляторного влияния микроокружения на функционирование МСК и открывают перспективы для изучения молекулярных механизмов этого влияния. Данные, полученные при анализе субпопуляций МСК с разной чувствительностью к 5-ФУ, могут быть учтены при построении модели стромального дифферона, о структуре которого в литературе нет единого мнения. Следует подчеркнуть, что оценка влияния 5-ФУ на строму

кроветворных органов имеет и практическое значение в связи с применением этого препарата в химиотерапии онкологических заболеваний.

В перспективе результаты проведенных исследований, прежде всего анализа дифференцировки МСК в различных условиях *in vitro* и *in vivo*, могут иметь значение для подбора оптимального источника МСК с целью их использования в клеточной терапии, а также для совершенствования протоколов культивирования МСК. Сведения, полученные при оценке способности МСК прикрепляться, пролиферировать и дифференцироваться на тех или иных субстратах, а также совместимости различных материалов с организмом реципиента, могут представлять ценность для разработки новых носителей с целью использования в тканевой инженерии.

Данные, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, могут найти применение в педагогическом процессе при чтении курсов лекций и написании учебных пособий по биологии развития и клеточной биологии.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Эффективность клонирования МСК из эмбриональных и дефинитивных органов гемопоэза, экспрессия ими поверхностных антигенов CD73 и CD90 и выраженность потенций к основным дифференцировкам коррелируют с кроветворной активностью органа, а пролиферативная активность клеток и степень накопления морфологических изменений в ходе пассирования – со стадией онтогенеза.

2. МСК костного мозга обладают большей способностью к адипогенезу, хондрогенезу и особенно к остеогенезу *in vitro*, по сравнению с клетками из печени и селезенки. Более выраженные дифференцировочные потенции МСК костного мозга по сравнению с клетками зародышевой печени проявляются также *in vivo* при их трансплантации в диффузионных камерах.

3. Воздействие 5-ФУ на МСК костного мозга и зародышевой печени обогащает популяцию клетками со сниженным пролиферативным потенциалом. Резистентные к 5-ФУ МСК из двух источников различаются между собой по степени сохранения остеогенных потенций в ходе пассирования: в культуре костного мозга эта субпопуляция теряет способность к остеогенезу быстрее, а в культуре зародышевой печени – медленнее, чем чувствительные к 5-ФУ клетки.

4. Фибронектин и коллаген I типа, а в случае клеток костного мозга также и ламинин, оказывают стимулирующее влияние на адгезию клоногенных МСК, обеспечивая их более раннее прикрепление к субстрату по сравнению с культуральным пластиком. При культивировании МСК костного мозга в индукционных средах коллаген I типа подавляет адипогенную дифференцировку, а фибронектин – остеогенную и адипогенную.

5. Полученные экспериментальные данные указывают на то, что в ходе индивидуального развития происходит функциональное созревание МСК, приводящее к изменению качества организуемого ими кроветворного микроокружения.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных данных подтверждена воспроизводимостью результатов при

повторении экспериментов, а также публикациями в рецензируемых журналах. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: I Съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2003), отчетной конференции Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН «Биология стволовой клетки» (Москва, 2004), I Съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2005), конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты» (Москва, 2005), симпозиуме с международным участием «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза» (Москва, 2007), II Съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2007), конференции «Современные проблемы биологии развития», посвященной 40-летию Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (Москва, 2007), симпозиуме «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий» (Санкт-Петербург, 2009), VI международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2009), VII международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2010), I международной научно-практической конференции «Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий» (Екатеринбург, 31 марта 2011), III конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты» (Москва, 2011), всероссийской научной конференции «Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2011), II международной научно-практической конференции «Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий» (Екатеринбург, 15 декабря 2011), III Съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012), всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2013), всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология — от науки к практике» (Уфа, 2014), IV Съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2014), 7-м ежегодном Всемирном конгрессе по регенеративной медицине и стволовым клеткам (Хайкоу, Китай, 2014).

Личное участие автора. Непосредственное участие автора заключалось в планировании и организации исследований, выборе используемых моделей, проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных результатов, формулировке научных положений и выводов, написании статей по результатам работы. Соавторы указаны в публикациях.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 328 страницах, содержит 65 рисунков, 19 таблиц и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 886 цитируемых источников, и двух приложений с иллюстративным материалом.

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 статья, в том числе 16 – в журналах, соответствующих Перечню ВАК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы 14-20-суточные зародыши, 3-5-суточные и половозрелые крысы Wistar, а также 14- и 17-суточные зародыши, 1-2-суточные и половозрелые мыши гибриды F1 (СВА х С57Bl/6). Первым днем эмбриогенеза считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке у крыс или вагинальных пробок у мышей.

Эксперименты *in vitro*

Выделение и культивирование клеток. Клетки костного мозга выделяли, промывая диафизы бедренных и большеберцовых костей средой α -МЕМ (HyClone). Суспензию клеток печени, селезенки и мышц задних конечностей получали, механически измельчая ткань в культуральной среде. Ткань зрелой селезенки предварительно обрабатывали 0,25%-ным трипсином с ЭДТА (HyClone), а ткань зрелой печени – 0,1%-ным раствором коллагеназы I типа (Sigma). Фрагменты бедренных костей зародышей обрабатывали 0,1%-ным раствором коллагеназы, последовательно отбирая фракции через 10, 30 и 70 мин инкубации. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде α -МЕМ (при изучении спонтанного миогенеза – в среде DMEM) с 10-15% сыворотки плодов коровы с добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина (все – HyClone), плотность посева составляла 1-5x10⁶ клеток/мл. Среду сменяли через 7 суток. Для клонального анализа культуры клеток от половозрелых животных фиксировали через 11-12 суток после посева, от зародышей – через 8 суток. В экспериментах с пассируемыми культурами клетки снимали трипсином с ЭДТА и пересевали с плотностью 1x10⁴ – 1x10⁵ клеток/мл. Для морфологического и иммуноцитохимического анализа культуры фиксировали по достижении 50-70% конфлюэнтности.

Изучение адгезии КОЕ-Ф и миогенных клеток к белкам внеклеточного матрикса. В качестве субстратов для прикрепления клеток использовали фибронектин из плазмы крови быка (Sigma), флаконы и платы BioCoat с коллагеновым и ламининовым покрытием (BD Biosciences), кислый коллаген I типа (получен из сухожилий хвостов крысы путем их обработки 0,1%-ным раствором уксусной кислоты), фибронектин из плазмы крови человека и его протеолитические фрагменты 120 кДа, 40 кДа и 60 кДа, а также нейтральный коллаген I типа (любезно предоставлены А.А. Мининым, ИБР РАН). Нейтральным коллагеном, фибронектином или его фрагментами культуральную посуду покрывали, нанося раствор белка в концентрации 50 мкг/мл и высушивая в течение 2 ч, а кислым коллагеном – инкубируя с ним в течение 30 мин при 37°C с последующей отмывкой.

Для оценки числа КОЕ-Ф, прикрепляющихся к субстрату в разные сроки культивирования, клетки инкубировали 7 суток во флаконах, покрытых изучаемыми белками, после чего сменяли среду и продолжали культивирование до образования колоний. Удаляемую при смене среду с неприкрепленными клетками переносили в новые флаконы с тем же покрытием и инкубировали в течение 7 суток (костный мозг) или 5 суток (зародышевая печень), после чего культуры фиксировали для подсчета колоний.

При исследовании адгезии миогенных клеток зародышевой печени к белкам внеклеточного матрикса их культивировали 10-12 суток в среде DMEM на 12-луночных платах с соответствующим покрытием и анализировали число миотуб, образуемых клетками, прикрепившимся за первые 7 суток инкубации.

Оценка сроков адгезии миогенных предшественников к пластику. Суспензию клеток из печени зародышей помещали в 12-луночную плату без белкового покрытия и культивировали в среде DMEM с 10% сыворотки плодов коровы в течение 1, 5 или 24 ч, после чего переносили в плату, покрытую фибронектином, а в исходную плату с прикрепившимися клетками добавляли свежую среду. Через 7 суток в обеих платах проводили смену среды и культивировали клетки еще 3 суток с последующим подсчетом образовавшихся миотуб.

Обработка клеток 5-фторурацилом. Чувствительность клеток к 5-ФУ (Sigma) определяли путем их обработки препаратом *in vitro* (инкубация 10×10^6 клеток/мл в α -MEM с 10% сыворотки плодов коровы и 50 мкг/мл 5-ФУ в течение 2 ч при 37°C) или *in vivo* (внутрибрюшинное введение 150 мг/кг 5-ФУ крысам-донорам за сутки до взятия клеток) с последующим культивированием в стандартных условиях.

Индукция дифференцировки МСК. Для индукции остео- или адипогенеза клетки рассевали в 12-луночные платы по 1×10^4 клеток/мл в остеогенную среду (α -MEM с 5% сыворотки плодов коровы с добавлением 10^{-8} М дексаметазона (Sigma), 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия (Fluka) и 10 мМ β -глицерофосфата натрия (Sigma)) либо по 3×10^4 клеток/мл в адипогенную среду (α -MEM с 10% сыворотки плодов коровы с добавлением 10^{-6} М дексаметазона, 0,2 мМ индометацина (Sigma), 0,01 мг/мл инсулина (Sigma) и 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина (Sigma). При изучении влияния факторов роста на остеогенез в среду дополнительно включали 2,5 нг/мл bFGF (Sigma) либо 100 нг/мл BMP-2 (Peprotech). Клетки культивировали с индукторами в течение 12-21 суток, меняя среду дважды в неделю.

Хондрогенез индуцировали в микромассовой культуре, осаждая 2×10^5 - 1×10^6 клеток центрифугированием в среде DMEM с 10 нг/мл TGF- β 1 (Sigma), 1% ITS+1 (Sigma), 10^{-8} М дексаметазона, 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия, 40 мкг/мл пролина (Sigma) и 100 мкг/мл пирувата натрия (HyClone); в некоторых опытах в среду включали также 100 нг/мл BMP-2. Контролем служили микромассовые культуры в среде того же состава, но без TGF- β 1 и BMP-2. Клетки культивировали 21 сутки, меняя среду дважды в неделю.

Для индукции миогенеза были использованы несколько протоколов:

1) Клетки культивировали на пластике, фибронектине или ламинине в среде DMEM с 10% сыворотки плодов коровы и 10 мкМ 5-азациитидина (Sigma) (в некоторых случаях с добавлением 10 нг/мл bFGF) в течение 24 ч, после чего среду сменяли на DMEM с 10% сыворотки и культивировали еще 14-19 суток.

2) Клетки культивировали 24 ч на пластике в среде DMEM с 2% сыворотки плодов коровы, 10 нг/мл EGF (Sigma), 10 нг/мл PDGF (Sigma), 1% ITS+1, 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия и 3 мкМ 5-азациитидина, либо на фибронектине в среде того же состава, но с 10 нг/мл bFGF вместо PDGF. Далее

культивирование продолжали в той же среде без 5-азациитидина в течение 11-14 суток.

3) Клетки культивировали 7 суток на фибронектине в среде DMEM с 10% сыворотки плодов коровы, к которой добавляли 50% среды, кондиционированной первичной культурой клеток из мышц 17-суточных зародышей крысы. Для исключения контаминации исследуемой культуры клетками из мышц кондиционированную ими среду пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Совместное культивирование различных клеточных популяций. Для оценки влияния факторов, секретируемых МСК костного мозга, на остеогенную дифференцировку МСК зародышевой печени клетки культивировали 14-17 суток в остеогенной среде в 6-луночных платах с мембранными вкладышами (Becton Dickinson, размер пор 0,4 мкм), помещая клетки печени на дно лунки, а клетки костного мозга - на поверхность вкладыша. Аналогичным образом для индукции миогенной дифференцировки МСК зародышевой печени их сокультивировали с миообластами линии C2C12 в среде DMEM с 10% сыворотки плодов коровы. МСК помещали на дно лунки, покрытое фибронектином, а миообласты – на вкладыш. Через 7 суток среду сменяли на DMEM с 5% сыворотки, общее время культивирования составляло 10 суток.

Культивирование МСК на носителях. В качестве носителей для МСК были протестированы коммерчески доступные биоматериалы на основе костного матрикса «Остеопласт-М» и «Остеопласт-Т» (НПК «Витаформ-Р», Россия) и коллагеновая гемостатическая губка (ОАО «Лужский завод “Белкозин”», Россия), а также полимерные криогели из коллагена, агарозы (в том числе с привитыми алкильными группами или желатиной), смеси агарозы с желатиной и диметилакриламида, изготовленные и любезно предоставленные В.И. Лозинским (Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН), и коллаген-хитозановая матрица, разработанная ГОУ ВПО "Красноярская государственная медицинская академия" МЗ РФ (Большаков и др., 2005). Фрагменты носителей помещали в 12-луночные платы с суспензией МСК в среде α -MEM с 10-15% сыворотки плодов коровы и культивировали от 2 ч до 28 суток.

Эксперименты *in vivo*

Эктопическая трансплантация печени зародышей. Зародышевую печень или ее фрагмент помещали в надраз почки половозрелым крысам под нембуталовым наркозом. Трансплантаты с окружающей почечной тканью фиксировали через 7, 13, 14 или 35 суток после операции.

Трансплантация клеток в диффузионных камерах. В диффузионные камеры (Millipore) в 100 мкл среды α -MEM вносили 1×10^8 свежевыделенных клеток костного мозга или зародышевой печени крысы либо 1×10^6 клеток, размноженных *in vitro*, и трансплантировали их в перитонеальную полость половозрелых крыс. Через 35, 42 или 49 суток камеры извлекали для фиксации.

Трансплантация клеток на носителях. Носители с культивируемыми на них клетками либо контрольные образцы тех же материалов без клеток

трансплантировали половозрелым крысам в надрез почки или под кожу. В ряде экспериментов носители загружали клетками непосредственно перед трансплантацией, нанося концентрированную клеточную суспензию на сухой материал. Трансплантаты фиксировали после 21 – 70 суток после операции.

Анализ результатов

Морфологические исследования. Монослойные культуры МСК фиксировали 96⁰-ным спиртом и окрашивали азур-эозином. Микромассовые культуры в хондрогенной среде фиксировали 4%-ным формалином, окрашивали гематоксилином, толуидиновым синим или альциановым синим и приготавливали тотальные препараты. Парафиновые срезы трансплантатов и нативных органов, зафиксированные смесью Ценкера или Карнуа, окрашивали гематоксилин-эозином или азур-эозином. Криостатные срезы для иммуноцитохимического анализа получали после фиксации материала 4%-ным параформальдегидом, пропитывания в течение суток 20%-ным раствором сахарозы на PBS и замораживания в парах азота.

Цитохимические исследования. Для оценки активности щелочной фосфатазы (ЩФ) проводили реакцию азосочетания согласно протоколу фирмы-производителя (Sigma), соли Ca²⁺ выявляли путем окрашивания культур ализариновым красным S (Sigma), нейтральные жиры – окрашиванием смесью суданов III и IV или жировым красным O (Sigma).

Иммуноцитохимические исследования. Культуры фиксировали 4%-ным формалином, пермеабелизировали 0,25%-ным раствором тритона X-100 на PBS с 0,1% твина 20, блокировали неспецифическое связывание антител 3%-ным раствором БСА на PBS с 0,1% твина 20. Антиген Ki-67 выявляли методом прямого иммунофлуоресцентного окрашивания антителами, меченными ФИТЦ, остальные антигены – методом непрямой иммунофлуоресценции, используя вторые антитела с флуорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 568. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 или DAPI.

Выявление никотиновых холинорецепторов с помощью α -бунгаротоксина. Меченный тетраметилродамином α -бунгаротоксин (Sigma) добавляли к исследуемым культурам в концентрации 10⁻⁶ М на 30 мин при 37⁰ С. По окончании инкубации клетки отмывали раствором Хэнкса с 2 мг/мл БСА 30 мин при 37⁰ С и трижды - раствором Хэнкса без БСА, фиксировали 4%-ным формалином на PBS и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Молекулярно-генетический анализ. Тотальную РНК выделяли с помощью реактива TRI® Reagent (Sigma). кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы M-MLV и олиго(дТ)15, предварительно обработав тотальную РНК ДНКазой Turbo (Ambion). ПЦР проводили на матрице кДНК с использованием ColoredTaq полимеразы (Силекс М) и праймеров, сконструированных с помощью компьютерной программы DNASTar и международной базы данных NCBI, на амплификаторе Eppendorf Mastercycler. Предварительно кДНК нормировали по GAPDH. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в агарозном геле с бромистым этидием, интенсивность их свечения оценивали на УФ-трансиллюминаторе (BIO-RAD).

Количественный анализ и статистическая обработка результатов.

Эффективность клонирования МСК определяли подсчетом колоний и выражали как число КОЕ-Ф на 1×10^6 посаженных клеток. Пролиферативную активность оценивали по доле ядер с положительной реакцией на Ki-67, подсчитанной под микроскопом. Выраженность остеогенеза определяли по площади областей с реакцией на ЩФ или Ca^{2+} , измеренной на отсканированных изображениях лунок с помощью программы ImageJ (Abramoff et al., 2004), а адипогенеза – по числу клеток с жировыми включениями. Данные обрабатывали статистически с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни или экспресс-метода Стрелкова (Стрелков, 1999). Уровень значимости принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика клонального роста МСК в первичной культуре

Содержание КОЕ-Ф в популяциях клеток кроветворных органов и характеристика образуемых ими колоний. Клетки костного мозга, печени и селезенки крысы на разных стадиях онтогенеза формировали в первичной культуре гетерогенные по размеру колонии, состоящие в основном из фибробластов (рисунок 1). В культурах зрелого костного мозга и бедренной кости 20-суточных плодов преобладали рыхлые колонии, в культурах печени и селезенки – плотные. Эффективность клонирования КОЕ-Ф из исследуемых органов (таблица 1) в целом коррелировала с кроветворной активностью последних. Исключение составляла культура клеток из кости плодов, содержащей зачаток костного мозга с малочисленными кроветворными клетками: эффективность клонирования КОЕ-Ф из этого источника была более чем на два порядка выше, чем из зрелого костного мозга. Вероятно, это было связано с преобладанием в зародышевой кости способных к клональному росту механоцитов (в отличие от остальных изученных органов, состоящих большей частью из кроветворных клеток) и с тем, что, помимо зачатка костного мозга, в образование колоний могли вносить вклад другие ткани кости, также содержащие МСК. Динамика содержания КОЕ-Ф в остальных изученных органах, характеризующаяся высоким их числом в период активного гемопоэза и значительно меньшим в период его затухания, в общем согласуется с отмеченной в других работах (Van Den Heuvel et al., 1987; Wolf et al., 1995) и может косвенно указывать на миграцию стромальных предшественников в ходе онтогенеза для организации кроветворного микроокружения. Впрочем, нельзя исключить и гибель либо терминальную дифференцировку клоногенных МСК в печени и селезенке по завершении активного гемопоэза вследствие изменений в продукции цитокинов или составе внеклеточного матрикса.

Таблица 1. Эффективность клонирования КОЕ-Ф из кроветворных органов крысы и активность щелочной фосфатазы в образуемых ими колониях

Источник клеток	Эффективность клонирования, КОЕ-Ф на 1 млн клеток	Доля колоний, содержащих ЩФ⁺ клетки, %
Зрелый костный мозг	16,00±1,19 16,77±1,13 13,11±0,89 10,16±0,23	60,71±3,66% 95,71±3,83% 94,32±0,58%
Кость 20-суточных зародышей	5515,88±1211,51 4708,33±342,13 9819,44±862,75	4,72±1,10% 0,59±0,63% 7,00±1,08%
Печень 14-суточных зародышей	6,96±0,80 6,50±1,52 24,38±2,11	15,39±2,98% 5,55±2,73% 4,57±1,75%
Печень 16-суточных зародышей	14,67±1,59 4,67±0,51 24,26±2,24 16,16±1,21	22,36±8,77% 9,06±4,20%
Печень 20-суточных зародышей	5,31±1,10 3,78±0,62 1,26±0,09	4,65±1,33% 2,47±2,15% 10,50±6,45%
Зрелая печень	4,18±1,26 0,008 ± 0,010 0,00±16,33 0,00±14,09	27,09±9,00%
Селезенка 20-суточных зародышей	12,48±0,60 22,86±3,39 18,69±0,94	26,78±2,37% 81,91±4,05% 54,07±9,41%
Зрелая селезенка	2,97±0,58 9,25±1,51 5,73±1,89	6,72±2,58% 28,84±4,78% 16,68±5,63%

Большинство колоний, образуемых КОЕ-Ф зрелого костного мозга, содержали клетки с положительной реакцией на ЩФ – маркер остеогенных клеток (Owen et al., 1987; Sogo et al., 2007). Доля таких клеток в составе колонии часто превышала 50%. В культурах клеток из остальных источников лишь немногие колонии содержали отдельные фибробласты или мелкие группы

фибробластов со слабой или умеренной реакцией. Очевидно, обилие остеогенных клеток среди МСК костного мозга отражает потребность костной ткани в физиологической и репаративной регенерации; с этой точки зрения объяснима малочисленность подобных клеток в печени и селезенке, где остеогенез в норме отсутствует. Экспрессия ЩФ лишь немногими клетками из

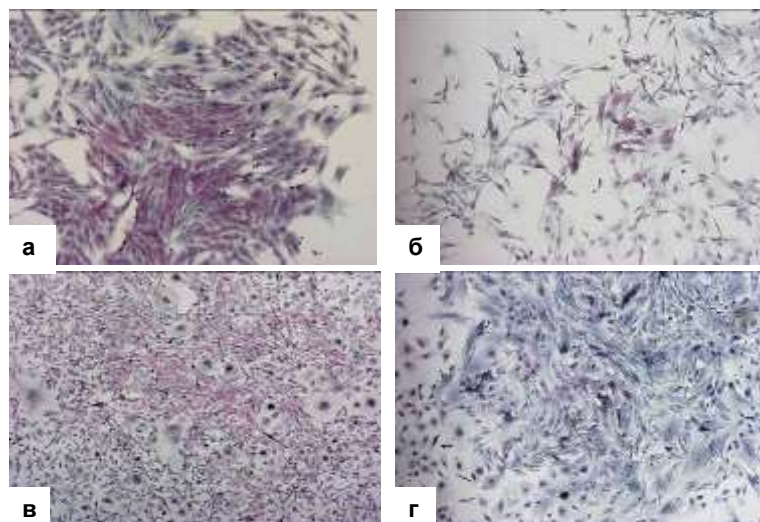


Рисунок 1. Колонии, образованные КОЕ-Ф: а – костного мозга половозрелой крысы; б – бедренной кости 20-суточных зародышей; в - печени 16-суточных зародышей; г - селезенки 20-суточных зародышей. Реакция на ЩФ, ядра окрашены гематоксилином. Увел.: об. х4, ок. х10.

кости зародыша – весьма неожиданный факт, однако сходные данные получали и другие авторы, сообщавшие о значительно меньшей доле колоний, содержащих ЩФ, в культуре костного мозга новорожденных мышей по сравнению с половозрелыми (Van Den Heuvel et al., 1991 а). Не исключено, что остеогенез в конечности плода обусловлен дифференцировкой не столько клоногенных МСК, сколько более зрелых предшественников.

Культуры клеток из исследуемых источников были

проанализированы на присутствие антигенов CD73 и CD90, применяемых для идентификации МСК (Dominici et al., 2006), а также CD106 - молекулы адгезии, опосредующей регуляторные взаимодействия МСК с кроветворными клетками (Simmons et al., 1992; Gronthos et al., 2003). **CD73** (рисунок 2) был выявлен во многих колониях, образованных КОЕ-Ф зрелого костного мозга и печени 16- или 20-суточных зародышей; доля несущих его клеток в этих культурах варьировала от 25% до 60%. В культурах печени 14-суточных зародышей таких клеток было, как правило, не более 10%. На клетках из кости 20-суточных плодов, печени 5-суточных крыс и зрелой селезенки CD73 практически отсутствовал. В культурах селезенки зародышей содержащие его клетки (до 50% от общего числа) были выявлены лишь в некоторых экспериментах. **CD90** (рисунок 3) имелся на 80-95% клеток из зрелого костного мозга и зародышевых кости, печени и селезенки, но отсутствовал на клетках постнатальной печени и практически не выявлялся в культуре зрелой селезенки. **CD106** (рисунок 4) присутствовал лишь на немногих клетках из всех источников: в культурах зрелого костного мозга и кости плодов их доля составляла 10-15%, в культурах зародышевой и зрелой селезенки – 6-7%, а в культурах печени – около 15% у 14-суточных зародышей и 5-суточных крыс и не более 5% у 16- и 20-суточных зародышей.

Таким образом, наличие на стромальных клетках CD73 и CD90 было характерно для активно кроветворящих органов, а присутствие CD106 не

зависело от активности гемопоэза, несмотря на участие этой молекулы в связывании кроветворных клеток (Simmons et al., 1992). По некоторым данным, клетки, несущие CD106, более способны к адипогенезу и менее – к остеогенезу, чем лишенные его, и, возможно, представляют собой наименее зрелую субпопуляцию МСК (Boxall, Jones, 2012).

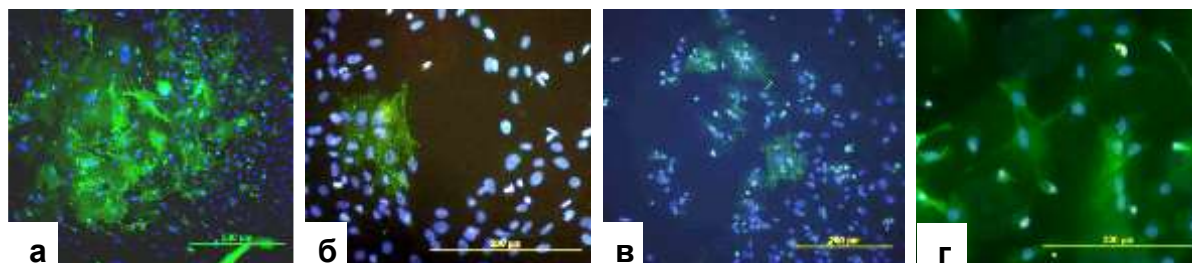


Рисунок 2. CD73 в первичной культуре: а – костного мозга половозрелой крысы; б – печени 14-суточных зародышей; в – печени 16-суточных зародышей; г – селезенки 20-суточных зародышей. Зеленый цвет – CD73, синий - DAPI (а, в) или Hoechst 33342 (б, г).

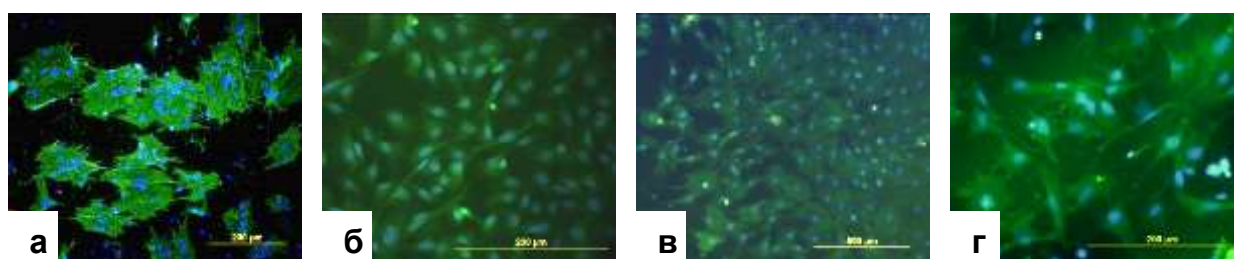


Рисунок 3. CD90 в первичной культуре: а – костного мозга половозрелой крысы; б – печени 14-суточных зародышей; в – печени 20-суточных зародышей; г – селезенки 20-суточных зародышей. Зеленый цвет – CD90, синий - DAPI (а) или Hoechst 33342 (б - г).

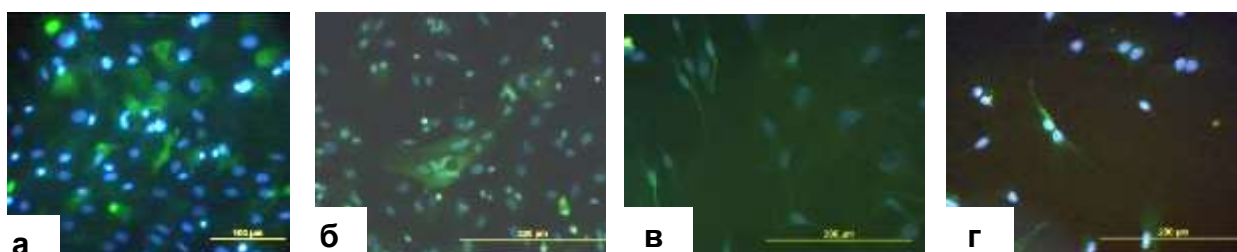


Рисунок 4. CD106 в первичной культуре: а – костного мозга половозрелой крысы; б – печени 16-суточных зародышей; в – печени 5-суточной крысы; г – селезенки половозрелой крысы. Зеленый цвет – CD106, синий - Hoechst 33342.

Экспрессия CD73 и CD90 в первичных культурах кости 20-суточных плодов, зародышевой и зрелой селезенки подтверждена с помощью ПЦР-анализа, примененного также для выявления мРНК еще одного маркера МСК – CD105 (Dominici et al., 2006). Клетки этих органов экспрессировали гены CD90 и CD105 на высоком уровне, а экспрессия ими CD73 была слабой, что в целом согласуется с данными иммуноцитохимического анализа. В предыдущих исследованиях (Кожевникова и др., 2010) мРНК CD73, CD90 и CD105 была выявлена в первичных культурах печени 14-, 16- и 20-суточных зародышей, причем в клетках 14-суточных зародышей уровень экспрессии гена CD73 был низким, возможно, из-за незрелости кроветворной стромы печени.

Таким образом, клоногенные стромальные клетки из исследуемых источников имели различия в фенотипе, коррелирующие с кроветворной активностью органа. В сочетании с оценкой эффективности клонирования КОЕ-Ф это позволяет предположить, что и печень, и селезенка, и костный мозг содержат наибольшее число МСК в период активного гемопоэза. Отмечена также фенотипическая гетерогенность клеток каждой культуры, в том числе в пределах колонии. Возможно, клетки колоний, лишенные маркеров МСК, представляют собой дифференцированные фибробласты, однако анализ этого вопроса затруднен отсутствием четких критериев для разграничения фибробластов и МСК.

2. Гетерогенность клеточного состава стромы зародышевой печени

Адгезивность к пластику, лежащая в основе методов выделения МСК, не уникальна для них, из-за чего получаемые таким образом культуры могут содержать примесь других клеток. По нашим наблюдениям, в первичных культурах органов гемопоэза, прежде всего печени, присутствовали морфологически отличные от фибробластов клетки, очевидно, не являющиеся МСК. Мы охарактеризовали морфологию и фенотип этих клеток с целью выяснить их возможное происхождение и судьбу при субкультивировании.

Миофибробласты. Клетки с морфологией миофибробластов – очень крупные и распластанные, с одним или двумя рыхлыми ядрами и волокнистыми структурами в цитоплазме – обнаруживались в первичной

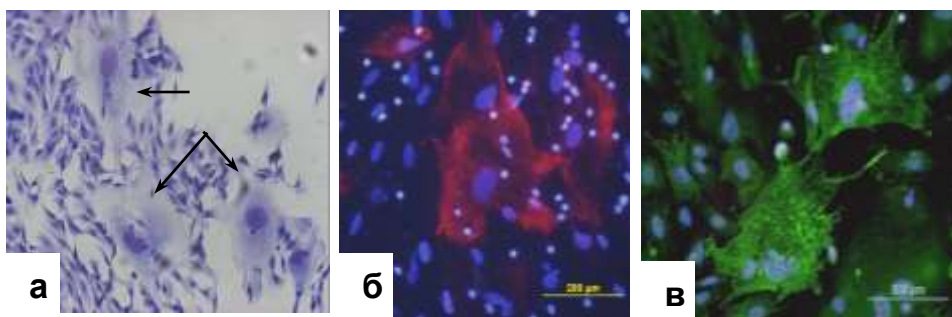


Рисунок 5. Миофибробласты в первичной культуре печени зародышей 14 (а, в) и 17 (б) суток развития: а – группа миофибробластов (указаны стрелками) в составе стромальной колонии (азур-эозин, увел.: об. $\times 10$, ок. $\times 10$); б – десмин (красный цвет); в – CD90 (зеленый цвет). Ядра окрашены Hoechst 33342 (б, в, синий цвет).

культуре печени, полученной от зародышей крысы всех изученных сроков развития – 14, 15, 16, 17 и 20 суток, а также на 3-5 сутки постнатального онтогенеза. Они встречались как в составе стромальных колоний, так и

вне их, поодиночке или кластерами, и обычно содержали десмин (рисунок 5 а, б). При пассировании культуры подобные клетки в одних опытах выявлялись на 3-м пассаже, в других – отсутствовали уже на 1-м.

Для выяснения их природы мы провели иммуноцитохимический анализ на специфические маркеры клеток Ито, переходящих *in vitro* в активированное состояние, и миофибробластов из области порталных триад. Сходные по морфологии и присутствию десмина (Ramadori, Saile, 2002), эти популяции могут быть различены по экспрессии рилина, являющегося маркером клеток

Ито и отсутствующего в портальных миофибробластах (Kobold et al., 2002), и CD90, выявляемого в портальных миофибробластах, но не в клетках Ито (Dudas et al., 2009). В миофибробластоподобных клетках первичной культуры печени зародышей был обнаружен CD90 (рисунок 5 в), но не рилин, что указывает на их принадлежность к портальным миофибробластам. По данным литературы, эти клетки способны размножаться *in vitro* (Knittel et al., 1999; Ramadori, Saile, 2002). Возможно, их расположение кластерами, иногда наблюдаемое в первичной культуре, было следствием пролиферации, но, судя по отсутствию крупных колоний, она не была активной, о чем может говорить и редкая встречаемость подобных клеток в пассируемых культурах.

Колонии черепицеобразных клеток. В первичных культурах печени 14- и 16-суточных зародышей встречались плотные колонии округлых, овальных или полигональных клеток (рисунок 6 а), иногда в сочетании с фибробластами (рисунок 6 б). Судя по присутствию панцитокератина (рисунок 6 в) и цитокератина-19, они имели эпителиальное происхождение. В колониях, содержащих наряду с черепицеобразными клетками и фибробластоподобные, цитокератин-19 выявлялся в клетках обоих типов. Более того, на него окрашивались некоторые колонии фибробластов, а изредка и миофибробластоподобные клетки. Встречались также единичные клетки с морфологией фибробластов или миофибробластов, экспрессирующие цитокератин-18, иногда одновременно с десмином. Возможно, эти наблюдения отражают явление эпителио-мезенхимного перехода, характерного для клеток печени в пренатальном онтогенезе (Chagraoui et al., 2003; Wenceslau et al., 2011). Предполагается возможность происхождения подобных клеток как из мезенхимного, так и из энтодермального компонента печени (Valdés et al., 2002; Li et al., 2011).

Несмотря на очевидную способность черепицеобразных клеток к пролиферации *in vitro*, на что указывали часто наблюдаемые в их колониях митозы и сам факт колониеобразования, при пассировании культуры мелкие группы подобных клеток, содержащих цитокератин-19, обнаруживались лишь на первом пассаже. По-видимому, эпителиальные клетки не выдерживали конкуренции с более активно пролиферирующими фибробластами либо теряли исходный фенотип в результате эпителио-мезенхимного перехода.

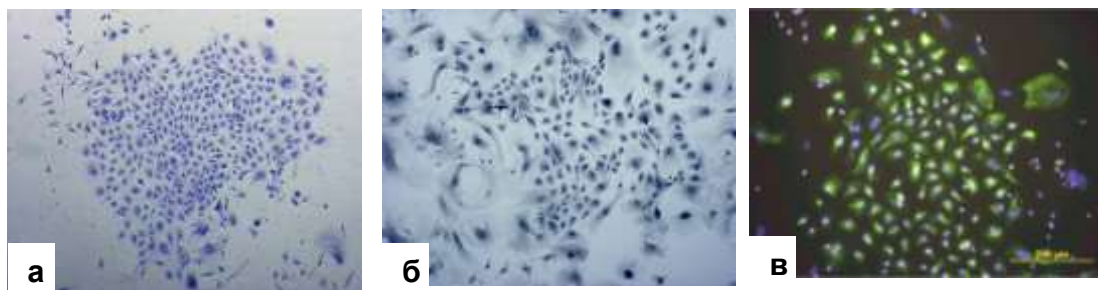


Рисунок 6. Колонии, содержащие черепицеобразные клетки, в первичной культуре печени зародышей 14 (а) и 16 (б, в) суток развития: а – общий вид колонии черепицеобразных клеток (азур-эозин, увел.: об. х 4, ок. х10); б – смешанная колония, содержащая черепицеобразные и фибробластоподобные клетки (гематоксилин, увел.: об. х4, ок. х10); в – панцитокератин (зеленый цвет); ядра окрашены Hoechst 33342 (синий цвет).

Скелетно-мышечные элементы. Вытянутые или разветвленные симпласты с морфологией скелетно-мышечных миотуб (рисунок 7 а), обычно расположенные рыхлыми скоплениями, встречались в первичных культурах печени 16- или 17-суточных, реже – 15- и 20-суточных зародышей (Паюшина и др., 2009 а; Шевелева и др., 2011), а иногда и в культурах зародышевой

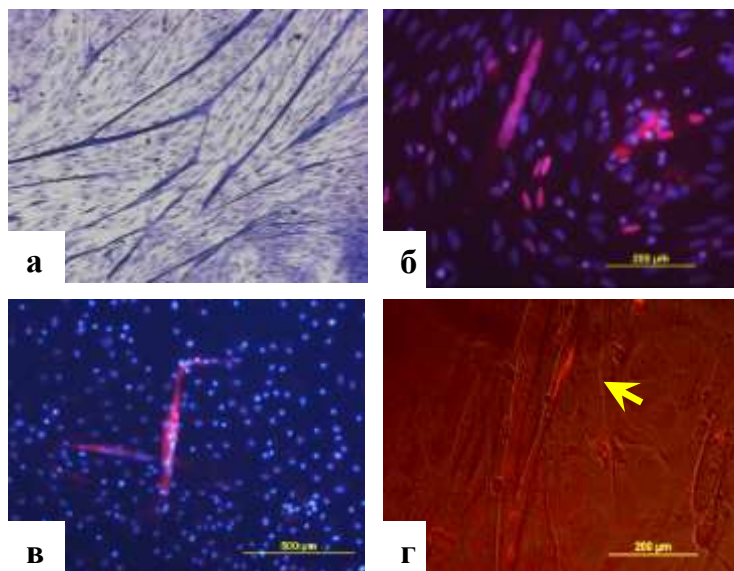


Рисунок 7. Спонтанный миогенез в первичной культуре клеток печени 17-суточных зародышей: а – скопление миотуб (азур-эозин, увел.: об. x4, ок. x10); б – MyoD (красный цвет); в – миозин 2-го типа (красный цвет); г – связывание α -бунгаротоксина, меченного тетраметилпродамино (красный цвет), с миотубами (участок связывания показан стрелкой). Синий цвет - Hoechst 33342 (б, в).

селезенки. Их число возрастало при покрытии поверхности фибронектином или коллагеном I типа. Скелетно-мышечная природа этих структур подтверждалась присутствием в них факторов транскрипции MyoD и Myf5, а также м-кадгерина, десмина и миозина 2-го типа (рисунок 7 б, в). Некоторые миотубы связывали агонист никотиновых

холинорецепторов α -бунгаротоксин (рисунок 7 г), что говорило об их функциональной зрелости.

Анализ адгезивных свойств миогенных клеток из печени 17-суточных зародышей показал, что все они прикрепляются к пластику за первые 24 ч

инкубации. По данным литературы, столь быстрая адгезия к субстрату свойственна миобластам, тогда как более ранние популяции мышечных предшественников в течение этого срока могут сохраняться во взвеси (Qu-Petersen et al., 2002).

В пассивируемых культурах клеток из печени зародышей миотубы формировались крайне редко, а MyoD, как правило, не обнаруживался.

Возникает вопрос о происхождении миогенных клеток в культурах зародышевой печени. Иммуногистохимический анализ ее срезов выявил в некоторых клетках MyoD, что подтверждает изначальное присутствие в печени коммитированных миогенных предшественников, возможно, заселяющих ее в ходе миграции из сомитов в область формирования скелетных мышц (Шевелева и др., 2011). Вероятно, микроокружение печени препятствует реализации миогенных потенций этих клеток, а при выделении в культуру создаются условия, способствующие их пролиферации и дифференцировке.

В целом результаты анализа клеточного состава первичной культуры печени зародышей позволяют охарактеризовать ее как высокогетерогенную популяцию, содержащую множество типов клеток, не являющихся МСК. Очевидно, они уступают МСК по пролиферативной активности и постепенно исчезают в ходе пассирования, вследствие чего популяция становится более гомогенной. В связи с этим дальнейшие эксперименты по сравнительной характеристике МСК из разных органов были выполнены на пассируемых культурах, не содержащих значительной примеси посторонних клеток.

3. Характеристика МСК в монослое при последовательном пассировании (субкультивировании)

Последовательный пересев культуры МСК позволяет не только очистить популяцию, но и нарастить клеточную массу. Однако в связи с имеющимися данными о потере исходных свойств МСК при длительном пассировании (Bonab et al., 2006; Neuhuber et al., 2008) в своей работе мы избегали многократного пересева, анализируя клетки после 1-4 пассажей. Прежде всего был исследован их рост в стандартной среде без индукторов дифференцировки.

В пассируемых культурах клеток из всех изученных источников – зрелого костного мозга, бедренной кости 20-суточных зародышей, печени 14-, 16- и 20-суточных зародышей, зародышевой и зрелой селезенки – присутствовали как узкие веретеновидные фибробласты, так и имеющие сильно распластанную форму, характерную для стареющих клеток. На 1-м пассаже во всех культурах преобладали узкие клетки. При дальнейшем пассировании доля плоских клеток в культуре костного мозга возрастала на 3-м пассаже, а в культуре зрелой селезенки – уже на 2-м, тогда как большинство клеток из печени и селезенки зародышей соответственно на 3-м и 2-м пассажах оставались узкими. Это может означать, что МСК из органов зародыша менее подвержены старению по сравнению с клетками зрелого организма, о чем сообщают и другие авторы (Guillot et al., 2007; Asumda, Chase, 2011; Zhang et al., 2012).

Анализ активности ЩФ показал, что в культуре костного мозга доля содержащих ее клеток к 4-му пассажу несколько снижалась, а интенсивность реакции обычно ослабевала, что может говорить об умеренном снижении остеогенных потенциалов в ходе пассирования. В культуре печени 16-суточных зародышей на первых двух пассажах реакция на ЩФ практически отсутствовала, но в некоторых случаях усиливалась при дальнейшем пассировании. Не исключено, что МСК зародышевой печени при длительном культивировании могли коммитироваться к остеогенезу.

Для оценки пролиферативной активности МСК было использовано иммуноцитохимическое выявление антигена Ki-67, известного как маркер клеток в цикле (Scholzen, Gerdes, 2000). Результаты приведены в таблице 2. На 1-м пассаже наименьшей пролиферативной активностью обладали клетки половозрелых животных, а в культурах печени и селезенки доля

пролиферирующих клеток была максимальна на стадии наиболее активного гемопоэза в этих органах. В то же время в культуре кости 20-суточных плодов, где костный мозг лишь начинает формироваться, доля Ki-67⁺ клеток была не меньшей, чем в культуре активно кроветворящего зрелого костного мозга. Таким образом, доля пролиферирующих стромальных клеток зависела как от активности гемопоэза в органе, что, видимо, указывает на участие МСК в построении кроветворного микроокружения, так и от стадии онтогенеза. В ходе пассирования пролиферативная активность снижалась, причем в культурах клеток из зрелых органов – в большей степени, чем из зародышевых.

Таблица 2. Ki-67 в пассируемых культурах МСК

Источник клеток	Пассаж	Длительность культивирования, сут	Доля Ki-67 ⁺ клеток
Зрелый костный мозг	1	2	70,30±4,28%
	2	1	71,61±3,19%
	3	1	53,27±5,70%
	4	1	48,70±4,89%
Печень 14-суточных зародышей	1	1	75,40±4,28%
Печень 16-суточных зародышей	1	2	82,23±3,16%
	2	1	90,24±1,46%
	3	1	61,96±3,51%
Печень 20-суточных зародышей	1	4	72,86±2,60%
Кость 20-суточных зародышей	1	1	76,71±5,43%
Селезенка 20-суточных зародышей	1	2	87,11±2,18%
	2	1	52,67±3,87%
Зрелая селезенка	1	1	59,62±4,75%
	2	1	16,81±2,57%

Примечание. Культуры фиксировали по достижении 50-70% конфлюэнтности.

Как известно, антигенный фенотип МСК может изменяться в ходе культивирования. Иммуноцитохимический анализ на CD73, CD90 и CD106 показал сходство фенотипа пассируемых клеток каждого из изучаемых органов с таковым в первичной культуре. Так, CD90 присутствовал на 75-98% клеток из зрелого костного мозга, зародышевых печени и селезенки и на 50-60% клеток из кости плодов; на клетках зрелой селезенки он выявлен не был. CD73 имелся на 60-90% клеток из зрелого костного мозга и 50-70% клеток из печени

зародышей (кроме 14-суточных, в культуре от которых его несли лишь 15-30% клеток). В культуре кости плодов он отсутствовал или выявлялся не более чем на 25% клеток. В культурах зародышевой и зрелой селезенки его также содержали только немногие клетки, доля которых не превышала 20%. Клетки, несущие CD106, во всех культурах были, как правило, малочисленны. Существенных изменений фенотипа культур в ходе пассирования не отмечено, кроме некоторого повышения содержания CD106⁺ клеток в культуре зрелого костного мозга и печени 16-суточных зародышей. В целом фенотип клеток из большинства изученных источников, кроме зрелой селезенки, соответствовал описанному для МСК (Gronthos et al., 2003; Dominici et al., 2006). Однако использованный нами минимальный набор маркеров, очевидно, должен быть дополнен анализом потенциалов МСК к дифференцировке, чему и были посвящены дальнейшие исследования.

4. Дифференцировка МСК in vitro в индукционных средах

Остеогенез. После 14-21 суток культивирования в остеогенной среде МСК

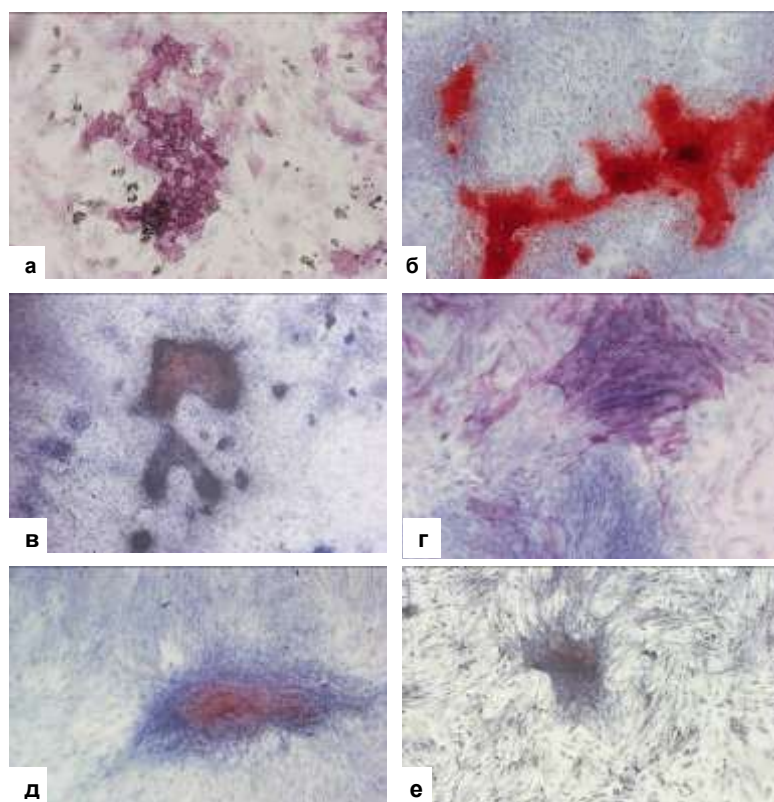


Рисунок 8. Остеогенная дифференцировка МСК: а, б – зрелого костного мозга; в – бедренной кости 20-суточных зародышей; г – печени 14-суточных зародышей; д – печени 16-суточных зародышей; е – селезенки 20-суточных зародышей. Ализариновый красный S (б, в, д, е), реакция на ЩФ (а, г), ядра докрашены гематоксилином. Увел.: об. x4, ок. x10.

зрелого костного мозга образовывали плотные скопления клеток с морфологией остеобластов: кубических или полигональных, с крупными светлыми ядрами и базофильной цитоплазмой (Кожевникова и др., 2008). Очаги остеогенеза интенсивно окрашивались на ЩФ (рисунок 8 а), во многих из них выявлялись соли Ca²⁺ (рисунок 8 б). Добавление в среду bFGF (в меньшей степени – BMP-2) увеличивало число и размер костных узелков. Дифференцировка МСК из кости 20-суточных зародышей была выражена слабее: формировались мелкие плотные узелки из кубических базофильных клеток, во многих случаях (но

не всегда) окрашивающиеся на ЩФ, а иногда и слабо минерализованные (рисунок 8 в). МСК из **печени 14-суточных зародышей** в остеогенной среде образовывали плотные скопления клеток (чаще фибробластоподобных, чем кубических), как правило, с реакцией на ЩФ, но без минерализации (рисунок 8 г). Сходные очаги остеогенеза наблюдались в культуре МСК из **печени 16-суточных зародышей**, однако некоторые из них были слабо минерализованы (рисунок 8 д); дифференцировка существенно не усиливалась ни при добавлении bFGF или BMP-2, ни при сокультивировании в остеогенной среде с МСК костного мозга. МСК из **печени 20-суточных плодов** не проявляли признаков остеогенеза (Паюшина и др., 2011). Картина дифференцировки МСК **зародышевой селезенки** была подобна таковой в культуре клеток из печени 16-суточных зародышей (рисунок 8 е); в культуре МСК **зрелой селезенки** остеогенез отсутствовал.

Таким образом, единственным из изученных органов, клетки которого имели выраженную способность к остеогенезу, был костный мозг. Очевидно, потенции МСК различных органов отражают их неодинаковое функциональное значение: участие в формировании костной ткани является одной из основных

функций МСК в костном мозге, но не в печени или селезенке.

Адипогенез. МСК **зрелого костного мозга** (рисунок 9 а) в адипогенной среде через 10-12 суток образовывали скопления мультилокулярных адипоцитов на разных стадиях накопления жира (Кожевникова и др., 2008). Подобные скопления формировали и МСК из **кости 20-суточных плодов** (рисунок 9 б). В культуре МСК из **печени зародышей**

также образовывались клетки с жировыми включениями (рисунок 9 в–д), однако они обычно появлялись позднее, чем в культурах костного мозга (после 14-18 суток индукции), были более

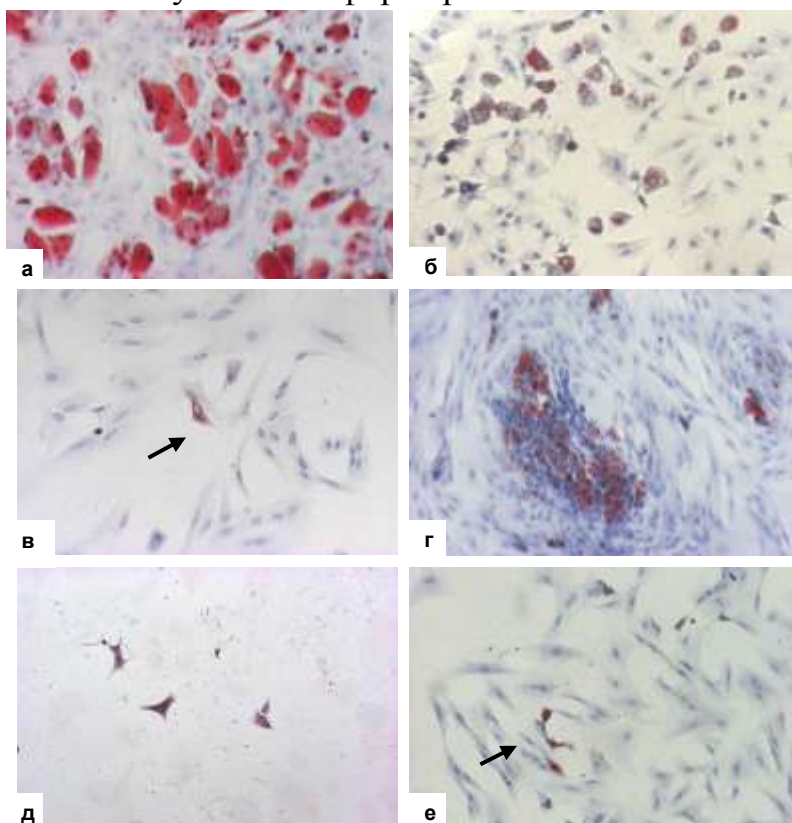


Рисунок 9. Адипогенная дифференцировка МСК: а – зрелого костного мозга; б – кости 20-суточных зародышей; в – печени 14-суточных зародышей; г – печени 16-суточных зародышей; д – печени 20-суточных зародышей; е – селезенки 20-суточных зародышей. Адипоциты показаны стрелками (в, е). Судан III и IV (а, г), жировой красной О (б, в, д, е). Увел.: об. x10, ок.x10.

мелкими и вытянутыми и содержали меньше жировых вакуолей. При этом адипогенные потенции МСК из печени зависели от срока развития: слабые у клеток 14-суточных зародышей, они достигали максимума после 16 суток эмбриогенеза и снижались к 20 суткам (Паюшина и др., 2011). Таким образом, динамика изменения адипогенных потенций МСК из печени была сходна с таковой для их остеогенных потенций, коррелируя с активностью гемопоэза и эффективностью клонирования КОЕ-Ф. МСК из **селезенки** от зародышей и особенно от половозрелых крыс в индукционной среде не подвергались активному адипогенезу; появлялись лишь малочисленные клетки с включениями жира, обычно сохраняющие форму фибробластов и не образующие крупных скоплений (рисунок 9 е).

Хондрогенез. В хондрогенных условиях МСК **зрелого костного мозга** формировали рыхлые сферические агрегаты из округлых клеток с эксцентрично

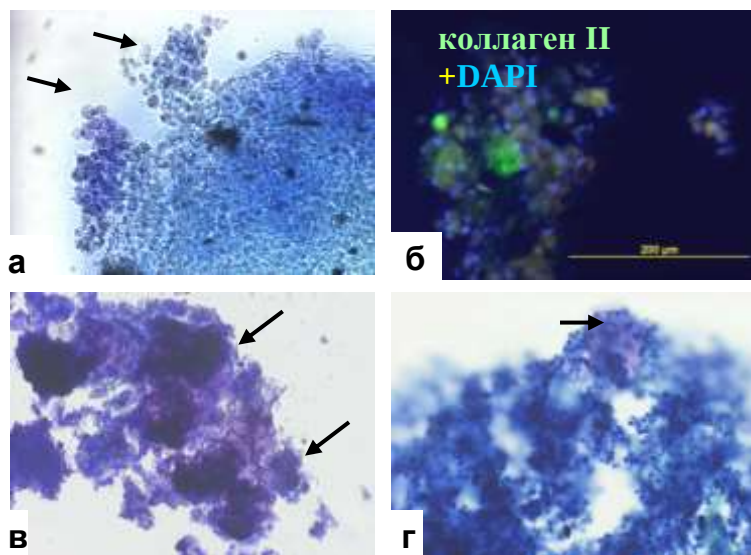


Рисунок 10. Хондрогенная дифференцировка МСК: а, б – костного мозга; в – печени 16-суточных зародышей; г – селезенки 20-суточных зародышей. Толуидиновый синий (а, в, г; отложения гликозаминогликанов показаны стрелками); иммуноцитохимическое выявление коллагена II типа (б). Увел.: об. x20, ок. x10 (а, г); об. x10, ок. x10 (в).

расположенными ядрами. Результаты окрашивания толуидиновым синим или альциановым синим указывали на присутствие в межклеточном веществе небольшого количества гликозаминогликанов (рисунок 10 а), а иммуногистохимический анализ выявил локальные участки отложения коллагена II типа (рисунок 10 б). Сходные клеточные агрегаты формировались и в культуре МСК из **печени 16-суточных зародышей** или **селезенки 20-суточных зародышей**, но цитохимические признаки хондрогенеза наблюдались в

них редко и были, как правило, слабыми, особенно в случае селезенки (рисунок 10 в, г).

Таким образом, способность к хондрогенезу была наиболее выражена у МСК из зрелого костного мозга. Они не приобретали явных морфологических признаков хрящевой ткани, что согласуется с данными некоторых других авторов, проводивших эксперименты на клетках крысы (Zheng et al., 2007; Neuhuber et al., 2008), однако синтезировали характерные компоненты

хрящевого матрикса. Вопрос о соотношении хондрогенных потенций МСК из печени и селезенки требует дополнительного исследования.

Миогенез. Для оценки миогенных потенций МСК из костного мозга и зародышевой печени мы применили несколько протоколов индукции их мышечной дифференцировки с помощью химических индукторов (Шевелева и др., 2011), сокультивирования с клетками из мышц или добавления кондиционированной ими среды. В большинстве случаев эти воздействия не приводили к миогенезу. Однако в некоторых экспериментах клетки из печени

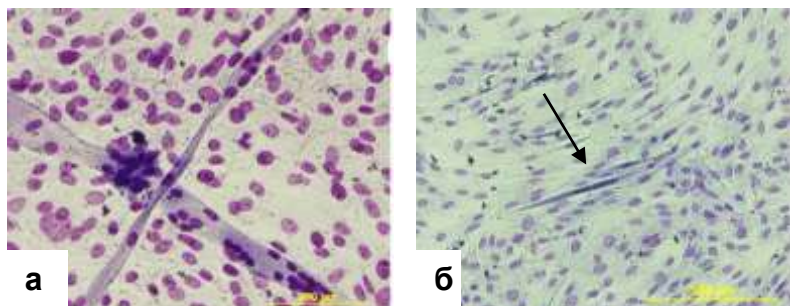


Рисунок 11. Миогенная дифференцировка МСК из печени 17-суточных зародышей: а – под действием 5-азацитидина в среде с EGF и bFGF; б - в среде, кондиционированной клетками из мышц 17-суточных зародышей (миотуба показана стрелкой).

зародышей формировали малочисленные миотубы после обработки 5-азацитидином и факторами роста (рисунок 11 а) или кондиционированной миобластами средой, (рисунок 11 б), а при их сокультивировании с миобластами в единичных ядрах появлялся MyoD, что

могло указывать на начальные стадии миогенеза. Полученные результаты говорят о слабости миогенных потенций МСК.

5. Сравнительный анализ субпопуляций МСК, различающихся по чувствительности к 5-ФУ

Чувствительность КОЕ-Ф печени зародышей и костного мозга половозрелых крыс к цитотоксическому действию 5-ФУ. Для сравнительного анализа чувствительности к 5-ФУ были избраны клетки из печени 16-суточных зародышей и зрелого костного мозга, представляющие клоногенные МСК соответственно пре- и постнатального организма. При обработке клеток 5-ФУ in vitro или in vivo число образуемых ими колоний снижалось, причем при введении препарата in vivo КОЕ-Ф костного мозга были значительно устойчивее к нему, чем клетки из печени зародышей (таблица 3).

В большинстве экспериментов после воздействия 5-ФУ формировались в основном мелкие рыхлые колонии, тогда как в контрольных культурах они были гетерогенны по размеру и плотности (Паюшина и др., 2006 б). Возможно, это было следствием менее активной пролиферации устойчивых к 5-ФУ предшественников или их меньшей зрелости, приводящей к более позднему образованию колоний.

Таблица 3. Влияние 5-фторурацила на КОЕ-Ф

Вариант			Число колоний на 1 x 10 ⁶ клеток	В том числе:		
				ЩФ ⁻	≤50% ЩФ ⁺ клеток	>50% ЩФ ⁺ клеток
Воздействие 5-ФУ <i>in vitro</i>	Костный мозг	опыт 1	контроль	9,41 ± 1,20	Не опр.	Не опр.
			5-ФУ	0,95 ± 0,13*	Не опр.	Не опр.
		опыт 2	контроль	3,89±0,41	50,44±3,67%	40,76±3,61%
			5-ФУ	1,27±0,07*	39,16±2,38%*	51,87±2,48%*
	Печень 16-суточных зародышей	опыт 1	контроль	19,51 ± 1,66	Не опр.	Не опр.
			5-ФУ	3,17 ± 0,53*	Не опр.	Не опр.
		опыт 2	контроль	9,61±0,41	93,05±2,08%	6,75±2,08%
			5-ФУ	2,88±0,27*	71,55±6,65%*	28,24±6,65%*
Воздействие 5-ФУ <i>in vivo</i>	Костный мозг	опыт 1	контроль	21,43 ± 1,09	Не опр.	Не опр.
			5-ФУ	8,31 ± 0,83*	Не опр.	Не опр.
		опыт 2	контроль	6,53±0,74	18,56±5,15%	66,36±3,75%
			5-ФУ	0,66±0,46*	0,00±16,33%	23,51±22,62%
	Печень 16-суточных зародышей		контроль	10,45 ± 1,29	Не опр.	Не опр.
			5-ФУ	0,21 ± 0,20*	Не опр.	Не опр.

Примечание. * - достоверные различия с контролем ($p < 0,05$).

Остеогенная и адипогенная дифференцировка субпопуляций МСК, различающихся по чувствительности к 5-ФУ. На 1-м пассаже МСК костного мозга, обработанные 5-ФУ, имели повышенную способность к формированию костных узелков в остеогенной среде и несколько уступали не обработанным им МСК по числу жировых клеток, образуемых в адипогенной среде. При пассировании резистентные к 5-ФУ клетки быстрее чувствительных к нему прекращали рост и в большей степени теряли потенции к остеогенезу; адипогенные потенции двух субпопуляций к 4-му пассажу становились сопоставимыми. Такие особенности устойчивых к 5-ФУ клеток подтверждают гипотезу о том, что обработка им, удаляя активно пролиферирующие мультипотентные МСК, обогащает популяцию коммитированными остеогенными клетками. Однако не исключено и присутствие в резистентной к 5-ФУ субпопуляции наиболее ранних членов стромального дифферона.

Анализ потенциалов МСК из печени зародышей выявил несколько иную картину. Резистентная к 5-ФУ субпопуляция МСК уступала чувствительной к нему по продолжительности активного роста, как и в случае МСК из костного мозга, то есть, видимо, содержала более зрелые клетки. На 1-м пассаже остеогенные потенциалы клеток, обработанных 5-ФУ, были подобны таковым контрольных клеток либо выражены несколько сильнее; соотношение адипогенных потенциалов варьировало от опыта к опыту. К 5-му пассажу обе популяции в сходной степени теряли способность к адипогенезу. В противоположность клеткам костного мозга, остеогенные потенциалы устойчивой к 5-ФУ популяции снижались в меньшей степени и позднее, чем у контрольных МСК, что не согласуется с гипотезой о преобладании в ней наиболее зрелых остеогенных предшественников. Возможно, различия в характеристиках фракций МСК, выживающих при воздействии 5-ФУ на клетки зрелого костного мозга и печени зародыша, отражают особенности структуры популяций стромальных клеток, обусловленные спецификой функций этих органов – в частности, неодинаковое содержание клеток, коммитированных к остеогенезу. Уточнение положения устойчивых к 5-ФУ субпопуляций в гистогенетическом ряду МСК из различных источников требует дальнейших исследований.

6. Влияние компонентов внеклеточного матрикса на клональный рост и дифференцировку МСК

Влияние адгезии к белкам внеклеточного матрикса на клональный рост МСК. Мы оценили эффективность клонирования МСК из зрелого костного мозга и печени 16-суточных зародышей при культивировании на ряде белков внеклеточного матрикса – фибронектине, коллагене I типа и ламинине. Усиленного по сравнению с пластиком прикрепления КОЕ-Ф к этим белкам за первую неделю инкубации выявлено не было, однако анализ популяции КОЕ-Ф, прикрепляющейся в последующую неделю, показал различия в динамике адгезии МСК к изучаемым субстратам (таблица 4).

После 7 суток инкубации на пластике значительная часть КОЕ-Ф костного мозга оставались в суспензии, образуя колонии только при последующем переносе в новый флакон. Возможно, это были наименее зрелые МСК, созревание которых до стадии КОЕ-Ф требует длительного пребывания во взвеси, но не исключено и открепление клоногенных клеток с субстрата. При инкубации на белках матрикса (прежде всего фибронектине и коллагене) в суспензии к этому сроку оставалось меньше КОЕ-Ф, чем при инкубации на пластике, что может говорить об их более быстром и/или более прочном прикреплении. Сходные результаты получены и при анализе клеток из печени зародышей, однако, судя по соотношению числа КОЕ-Ф, прикрепившихся и не прикрепившихся за 7 суток, они были более адгезивны ко всем изученным

субстратам, чем МСК костного мозга. Возможно, это связано с важной морфогенетической ролью адгезии клеток к матриксу в ходе эмбриогенеза.

Таблица 4. Эффективность клонирования КОЕ-Ф на разных субстратах

Источник клеток	Субстрат		Число КОЕ-Ф на 1×10^6 клеток	
			Адгезия в 1-ые 7 суток	Адгезия во 2-ые 7 суток
Костный мозг	Опыт 1	Пластик	2,42±0,37	7,42±0,86
		Фн (из плазмы быка)	9,78±0,39 *	2,05±0,39 *
	Опыт 2	Пластик	10,13±1,86	4,78±1,12
		Фн (из плазмы быка)	11,25±0,46	6,06±0,81
	Опыт 3	Пластик	3,83±0,91	4,43±1,40
		Фн (из плазмы человека)	2,25±0,54	1,28±0,75*
	Опыт 4	Пластик	0,23±0,11	0,18±0,08
		Ламинин (BioCoat)	1,04±0,88	0,66±0,67
		Коллаген I (BioCoat)	1,40±0,80	4,62±2,84
		Коллаген I (кислый)	1,33±0,83	0,60±0,22
	Опыт 5	Пластик	1,58±0,56	4,70±2,12
		Ламинин (BioCoat)	1,98±0,41	2,44±0,75
		Коллаген I (BioCoat)	1,02±0,09	0,96±0,34
		Коллаген I (нейтральный)	0,95±0,22	1,80±0,67
Печень 16-суточных зародышей	Опыт 1	Пластик	20,34±1,01	15,38±1,18
		Фн (из плазмы быка)	22,46±0,82	0,18±0,11
	Опыт 2	Пластик	15,38±1,18	1,23±0,57
		Фн (из плазмы быка)	17,48±0,51	0,23±0,19
		Ламинин (BioCoat)	8,44±2,24*	1,66±0,99
		Коллаген I (BioCoat)	5,70±0,45*	0,06±0,07*
	Опыт 3	Пластик	6,04±1,47	2,33±2,10
		Коллаген I (кислый)	19,70±1,02*	2,85±1,16
	Опыт 4	Пластик	9,20±1,85	4,40±2,45
		Фн (из плазмы человека)	6,28±1,10	0,15±0,16
		Коллаген I (нейтральный)	8,00±2,39	0,63±0,67

Примечание. Фн – фибронектин; BioCoat – флаконы BD Biosciences, покрытые коллагеном I типа или ламинином (BD Biosciences, США). * - достоверные различия между контролем (пластик) и опытом (белок матрикса) ($p < 0,05$).

Судя по активности ЦФ в колониях, при культивировании КОЕ-Ф костного мозга на фибронектине доля остеогенных клеток была ниже, чем на других субстратах. Для выявления участка молекулы фибронектина, ответственного за этот эффект, мы прокультивировали КОЕ-Ф костного мозга на фрагментах фибронектина молекулярной массой 120 кДа, 40 кДа и 60 кДа, содержащих соответственно связывающийся с клеткой, С-концевой

гепаринсвязывающий и коллагенсвязывающий домены, анализируя популяцию, прикрепляющуюся в первые 7 суток (таблица 5). Преимущественной адгезии КОЕ-Ф к какому-либо фрагменту отмечено не было, однако на фрагменте 120 кДа доля колоний, содержащих ЩФ, была ниже, чем в контроле, тогда как фрагменты 40 и 60 кДа на нее не влияли. Судя по полученным данным, в снижении остеогенных потенций МСК на фибронектине главную роль играет его домен, связывающийся с клеткой. Этот вывод подтверждается результатами экспериментов по индукции остеогенеза, описанных ниже.

Таблица 5. Адгезия КОЕ-Ф костного мозга к фибронектину и его фрагментам

Опыт	Субстрат	Число КОЕ-Ф на 1×10^6 клеток	Доля колоний, содержащих ЩФ ⁺ клетки, %		
			Неокрашенные	≤50% ЩФ ⁺ клеток	>50% ЩФ ⁺ клеток
1	Пластик	0,72±0,25	29,17±14,05%	70,83±14,05%	23,75±14,05%
	Фн	3,08±0,35*	75,00±6,81%*	25,00±6,81%*	12,78±4,67%
	120 кДа	2,44±0,42*	67,17±5,56%*	32,83±5,56%*	17,78±5,70%
	40 кДа	1,38±0,18*	28,83±7,59%	71,17±7,59%	23,03±4,55%
	120 кДа+40 кДа	2,83±0,32*	69,54±3,36%*	30,46±3,36%*	18,20±3,18%
2	Пластик	7,78±1,69	13,29±5,20%	27,13±4,02%	59,58±3,45%
	Фн	2,93±0,62*	47,46±8,36%*	21,32±6,79%	31,32±5,59%*
	60 кДа	6,25±1,21	17,84±5,07%	30,08±5,53%	52,08±6,37%
	120 кДа	7,50±0,91	36,78±3,48%*	26,45±4,37%	36,77±5,60%*
	40 кДа	6,83±1,29	22,88±1,99%	25,33±3,55%	51,79±3,26%
	120 кДа +40 кДа	7,78±2,20	44,70±4,66%*	24,64±4,12%	30,66±3,99%*
3	БСА	3,83±0,38	45,83±7,85%	41,55±6,16%	12,62±3,59%
	Фн	2,50±0,51*	54,84±14,28%	38,32±11,95%	6,83±3,31%
	60 кДа	3,70±0,24	43,22±3,18%	40,86±3,73%	15,92±2,06%
	120 кДа	3,20±0,40	78,54±2,28%*	19,09±3,26%*	2,37±0,98%*
	40 кДа	2,68±0,65	48,46±4,84%	34,41±3,83%	17,13±2,63%
	120 кДа+40 кДа	2,35±0,48*	71,83±9,90%*	24,48±7,13%	3,69±2,77%*

Примечание. Фн – фибронектин. * - достоверные различия между контролем (пластик или БСА) и опытом (фибронектин или его домен) ($p < 0,05$).

Остео- и адипогенная дифференцировка МСК на белках внеклеточного матрикса. Для оценки влияния матриксных белков на дифференцировку МСК в индукционных средах были использованы клетки из зрелого костного мозга в

связи с наибольшей выраженностью их остео- и адипогенных потенциалов по сравнению с МСК из остальных изученных источников. Адгезия к коллагену I типа или ламинину не оказывала воспроизводимого влияния на их остеогенную дифференцировку, тогда как на фибронектине большинство образующихся костных узелков оставались неминерализованными (рисунок 12). При культивировании МСК в остеогенной среде на фрагментах фибронектина минерализация подавлялась только на фрагменте 120 кДа: отложения Ca^{2+} на нем занимали $0,74 \pm 0,15\%$ общей площади, тогда как на пластике – $1,77 \pm 0,28\%$. Таким образом, влияние фибронектина на терминальную костную дифференцировку (как и на активность ЦФ в первичной культуре) опосредовано в первую очередь взаимодействием интегринов на МСК с его доменом, связывающимся с клеткой. О роли интегринов в регуляции остеогенеза неоднократно сообщалось (Gronthos et al., 2001 b; Martino et al., 2009), однако выяснение конкретных механизмов передачи сигнала требует дополнительных экспериментов.

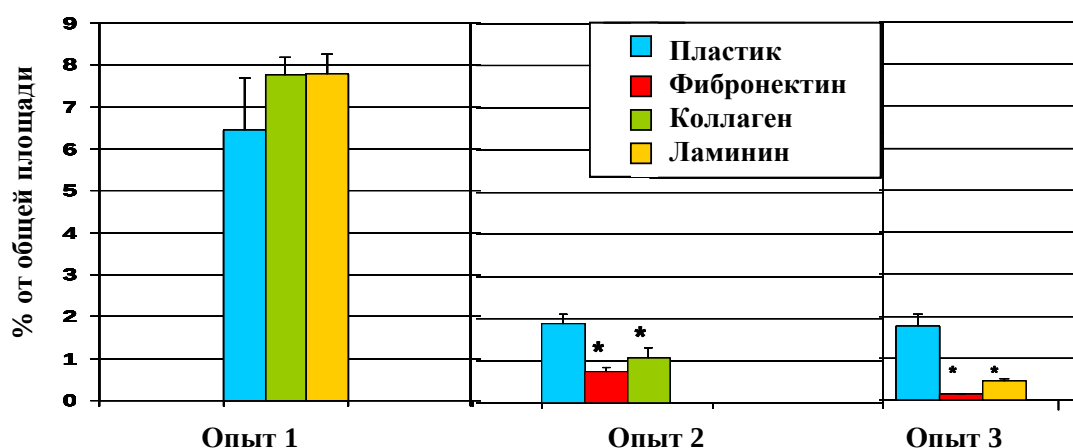


Рисунок 12. Площадь отложений Ca^{2+} в очагах остеогенной дифференцировки МСК костного мозга на различных субстратах (в процентах от общей площади поверхности лунки). * - достоверные различия между пластиком и белками матрикса ($p < 0,05$).

Оценка влияния матриксных белков на адипогенную дифференцировку МСК костного мозга показала, что на коллагене I типа и фибронектине жировых клеток образуется меньше, чем на пластике, а ламинин на их число не влияет (рисунок 13). Ряд авторов отмечают подавление адипогенеза при усиленном распластывании клеток на субстрате, объясняя его перестройкой цитоскелета, ведущей к активации киназы RhoA и коммитированию к остеогенезу (McBeath et al., 2004; Luo et al., 2008). Возможно, именно этот механизм ответственен за ингибирование адипогенеза на коллагене и фибронектине, обеспечивающих более прочную по сравнению с пластиком и ламинином адгезию МСК.

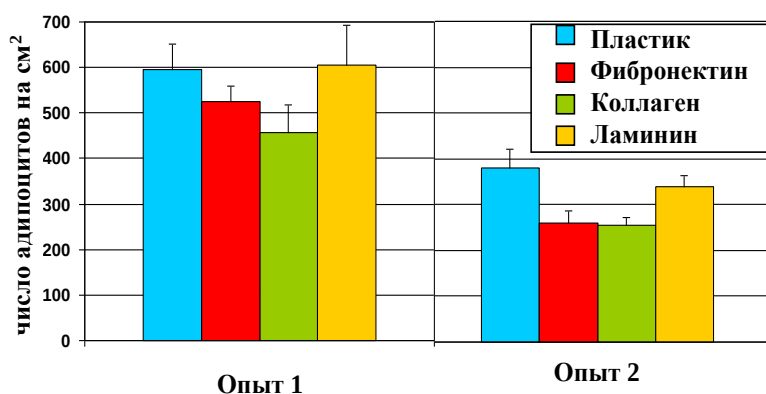


Рисунок 13. Число адипоцитов в культуре МСК костного мозга, инкубируемых в адипогенной среде на различных субстратах. * - достоверные различия между пластиком и белками матрикса ($p < 0,05$).

7. Экспериментальные подходы к изучению дифференцировки МСК *in vivo*

Трансплантация МСК зародышевой печени в составе тканевых фрагментов.

Экспериментальная модель эктопической трансплантации кроветворных тканей под капсулу почки была

разработана прежде всего для оценки способности стромальных клеток к формированию новых кроветворных территорий. Известно, что клетки костного мозга мыши, пересаженного таким образом, формируют кость и костномозговую строму, поддерживающую гемопоэз (Schofield, 1986), при трансплантации зрелой селезенки регенерирует ее белая и красная пульпа (Старостин, 1984), а в трансплантатах печени зародышей мыши образуется хрящ, впоследствии замещаемый костью с кроветворящим костномозговым органом (Старостин, Домарацкая, 2001).

Через 7 суток после эктопической пересадки печени, взятой от зародышей крысы различных сроков развития, мы обнаружили в некоторых трансплантатах печени 14- и 16-суточных зародышей островки типичного гиалинового хряща. Очевидно, микроокружение, создаваемое различными

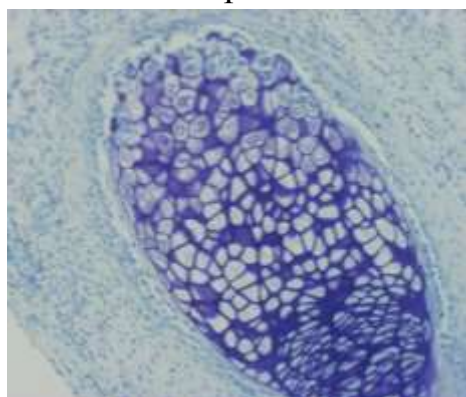


Рисунок 14. Хондрогенез в трансплантате печени 16-суточного зародыша крысы. 35 суток *in vivo*. Толуидиновый синий; увел: об. $\times 10$, ок. $\times 10$.

клетками трансплантата и реципиента, обеспечивало МСК зародышевой печени более подходящие условия для реализации хондрогенных потенций, чем индукционная среда *in vitro*. В отличие от вышеупомянутых экспериментов на мышах, хрящ сохранялся не менее 5 недель (рисунок 14). Частота его образования была не более 10% в случае 14-суточных зародышей и составляла 10-40% в случае 16-суточных. Трансплантаты печени 20-суточных плодов содержали лишь соединительную ткань, что может говорить о потере хондрогенных потенций МСК из печени в позднем пренатальном онтогенезе (Паюшина и др., 2011).

Трансплантация МСК костного мозга и зародышевой печени в диффузионных камерах.

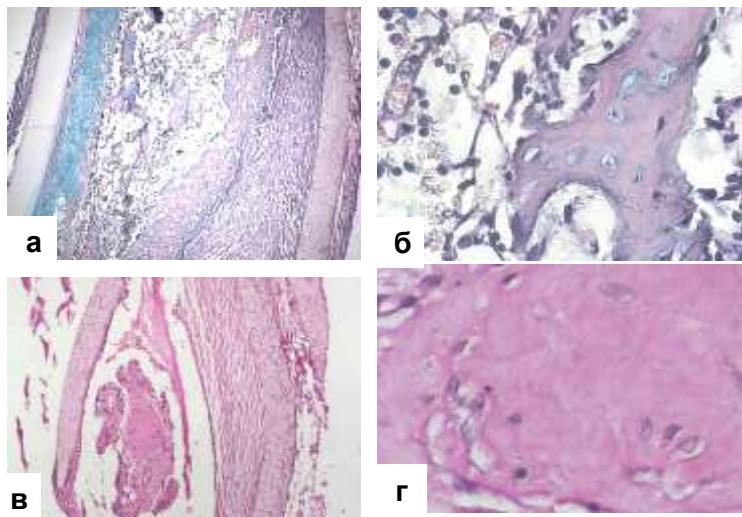


Рисунок 15. Срезы диффузионных камер с некультивированными клетками зрелого костного мозга (а, б) и печени 16-суточных зародышей (в, г) после трансплантации реципиентам. Альциановый синий, гематоксилин и эозин. Увел.: об. х4, ок. х10 (а, в); об. х 40, ок. х10 (б, г).

Преимущества данного метода экспериментальной трансплантации МСК связаны с тем, что диффузионная камера представляет собой закрытую систему, так что обнаружение в ней той или иной ткани однозначно свидетельствует о ее происхождении из трансплантированных клеток.

Мы применили эту модель для сравнительного анализа дифференцировки МСК из зрелого костного мозга и печени 16-суточных зародышей крысы. В большинстве диффузионных

камер с некультивированными клетками костного мозга после трансплантации реципиенту образовывалось значительное количество соединительной ткани, а в некоторых – хрящ, кость и костномозговая строма с очагами гемопоэза (рисунок 15 а, б). Некультивированные клетки из печени зародышей образовывали мало соединительной ткани, но иногда формировали небольшие участки кости (рисунок 15 в, г). При трансплантации пассируемых МСК костного мозга количество соединительной ткани и частота встречаемости очагов остео- и хондрогенеза были сходны для клеток 1-го, 2-го и 3-го пассажей. В камерах с МСК зародышевой печени 1-4-го пассажей развивалась только соединительная ткань. Эти данные говорят о том, что МСК костного мозга на протяжении по крайней мере трех пассажей сохраняют способность к остео- и хондрогенезу *in vivo*, а остеогенные потенции клеток из печени зародыша теряются в ходе культивирования.

Оценка пригодности различных материалов в качестве носителей для МСК. Актуальность экспериментальной трансплантации МСК на трехмерных пористых носителях связана прежде всего с потребностью в разработке тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины. Носитель для МСК должен обеспечивать их эффективную адгезию с сохранением потенций, быть нетоксичным для клеток и совместимым с организмом реципиента.

Мы протестировали ряд потенциальных носителей (биоматериалы на основе костного матрикса «Остеопласт-М» и «Остеопласт-Т», коллагеновую гемостатическую губку, коллаген-хитозановую матрицу, коллагеновые, агарозные и диметилакриламидные криогели), оценивая их биосовместимость и способность поддерживать выживание и рост МСК костного мозга или зародышевой печени *in vitro* и/или после пересадки крысам. В организме

реципиента «Остеопласт-М», collagen-хитозановая матрица и collagenовая губка резорбировались, а «Остеопласт-Т» и криогели на основе агарозы или диметилакриламида сохраняли исходную структуру. Все материалы, кроме диметилакриламидных криогелей, показывали хорошую совместимость с организмом, зарастая богато васкуляризованной соединительной тканью и не вызывая выраженного воспаления.

Однако их способность обеспечивать адгезию и рост МСК *in vitro* была слабой. После 3-11 суток культивирования клеток в носителях было мало; после 21-31 суток их содержание в collagenовом криогеле несколько возрастало, в collagen-хитозановой матрице и диметилакриламидном криогеле

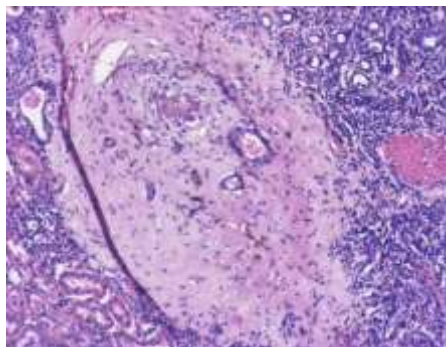


Рисунок 16. Остеогенез в почке крысы через 35 суток после трансплантации первичной культуры клеток костного мозга на collagen-хитозановой матрице. Гематоксилин-эозин; увел.: об. x10, ок. x10.

существенно не менялось, а в «Остеопласте-М», «Остеопласте-Т» и криогелях на основе агарозы – снижалось. Заселение клетками агарозного криогеля улучшалось при высоком содержании в нем желатины, но и тогда они не заполняли поры целиком. Нанесение МСК на «Остеопласт-М», collagen-хитозановую матрицу или гемостатическую губку непосредственно перед трансплантацией в большинстве случаев также не позволяло создать в носителе высокую концентрацию клеток. Малое число МСК в носителях, очевидно, препятствовало их эффективной дифференцировке *in vivo*: единственный случай остеогенеза был отмечен лишь в одном из опытов по трансплантации МСК костного мозга на collagen-хитозановой матрице (рисунок 16).

В целом по нашим результатам наиболее перспективными носителями для МСК представляются collagen-хитозановая матрица, collagenовый криогель, агарозные криогели с высоким содержанием желатины и, возможно, «Остеопласт-М», в большей степени по сравнению с остальными изученными материалами способствующие клеточной адгезии. Однако эффективная трансплантация МСК на данных носителях требует совершенствования методов их загрузки клетками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное изучение стромальных клеток костного мозга, печени и селезенки на разных стадиях развития позволило нам проследить динамику изменения содержания и свойств МСК в этих органах в ходе онтогенеза. Было обнаружено, что ряд характеристик МСК (антигенный фенотип, способность к остеогенезу, а в случае печени и селезенки также к клональному росту и адипогенезу, частота хондрогенеза в трансплантатах печени) коррелируют с активностью гемопоэза. В то же время отмечены и различия в свойствах МСК

из органов с сопоставимой кроветворной активностью – так, клетки из костного мозга и зародышевой печени неодинаковы по потенциям к дифференцировке, динамике адгезии и особенностям субпопуляций, резистентных к 5-ФУ. Наконец, некоторые характеристики МСК, прежде всего пролиферативная активность и скорость старения *in vitro*, зависят от стадии онтогенеза.

Анализ судьбы МСК в организме животных-реципиентов показал, что их потенции к дифференцировке *in vivo* не вполне соответствуют таковым *in vitro* и зависят от способа трансплантации. Так, клетки печени зародышей, трансплантированные в составе тканевых фрагментов, образуют хрящ, а в диффузионных камерах – кость. Вероятно, на судьбу МСК *in vivo* влияет микроокружение, включающее как факторы, поступающие от реципиента, так и различные клетки в составе трансплантата.

На основании выявленных различий в свойствах МСК в зависимости от их локализации и стадии онтогенеза нами предложена концепция развития организуемой этими клетками кроветворной ниши. Согласно этой концепции, в пренатальный период МСК неспособны в полной мере откликаться на стимулы, вызывающие дифференцировку, и их роль в поддержании гемопоэза состоит главным образом в трофическом влиянии на кроветворные клетки. Приобретение популяцией МСК компетентности к дифференцировке в ходе дальнейшего развития отражается на клеточном составе кроветворной ниши: в частности, в костном мозге в ней появляются клетки адипоцитарного и остеобластического рядов, также участвующие в поддержании гемопоэза. Изменение качества кроветворного микроокружения вследствие созревания МСК может иметь определяющее влияние на приобретение дефинитивных свойств стволовыми кроветворными клетками, в частности, на их переход от активного размножения в печени зародыша к состоянию покоя и самоподдержания в зрелом костном мозге.

Свойства МСК делают их прекрасным ресурсом для регенеративной медицины. Наши результаты показали, что для создания тканеинженерных эквивалентов костной, жировой и, возможно, хрящевой ткани наилучшим из изученных источников МСК является зрелый костный мозг, клетки которого наиболее способны к дифференцировке в этих направлениях. Однако не исключена возможность их использования МСК из печени или селезенки в протоколах клеточной терапии, основанных на трофической активности клеток. Поиск лучшего источника клеток для этих целей заслуживает отдельного исследования, как и вопрос о потенциальной туморогенности зародышевых МСК ввиду их высокой пролиферативной активности.

Важно для медицинской практики и понимание поведения МСК в организме реципиента. Для его анализа необходим поиск оптимального способа трансплантации этих клеток, обеспечивающего наиболее полное проявление их потенций. Это обстоятельство наряду с актуальностью разработки

тканеинженерных конструкций побудило нас протестировать ряд потенциальных носителей для МСК. В результате были выявлены наиболее перспективные из исследуемых материалов и указаны возможные пути к повышению эффективности их загрузки клетками – в частности, включение в состав носителя компонентов, усиливающих адгезию МСК.

Полученные нами данные открывают перспективы для изучения таких аспектов биологии МСК, как механизмы влияния компонентов внеклеточного матрикса на их дифференцировку, изменение свойств МСК различного происхождения при длительном культивировании, а также для комплексного сравнительного исследования способности МСК различной локализации к поддержанию гемопоэза.

Факты, полученные в работе, существенно расширяют представления о становлении популяции МСК в онтогенезе, об их роли в развитии и обеспечении стабильной жизнедеятельности организма. Ее результаты дают новые знания о процессе формирования кроветворной ниши, а также существенны для эффективного применения МСК в регенеративной медицине.

ВЫВОДЫ

В диссертации получены и проанализированы новые данные о процессе формирования дефинитивной популяции мезенхимных стромальных клеток (МСК) как ключевого компонента кроветворного микроокружения.

1. В кроветворных органах зародыша (печени, селезенке, кости с зачатком костного мозга), как и в зрелом костном мозге, выявлены клоногенные стромальные клетки с фенотипическими признаками, характерными для МСК. Впервые обнаружена корреляция динамики содержания этих клеток в печени и селезенке, а также присутствия на них антигенов CD73 и CD90, с кроветворной активностью органов на разных стадиях онтогенеза.

2. Первичная культура клеток печени зародышей отличается от таковой костного мозга более гетерогенным клеточным составом и содержит помимо фибробластов примесь миофибробластов, эпителиоцитов и миогенных предшественников, исчезающих в ходе пассирования.

3. В процессе пассирования стромальные клетки костного мозга, печени и селезенки сохраняют иммунофенотип, но постепенно снижают пролиферативную активность, причем клетки половозрелого организма по сравнению с таковыми зародыша характеризуются меньшей пролиферативной активностью и более ранним появлением признаков старения культуры.

4. Обнаружены межорганные различия в наборе и выраженности потенций МСК к дифференцировке. МСК селезенки и зародышевой печени отличаются от таковых из костного мозга меньшей способностью к остео-, адипо- и хондрогенезу. Выраженность потенций МСК из печени и селезенки к остео- и

адипогенезу *in vitro*, а также потенциал МСК из печени к хондрогенезу *in vivo* меняется в ходе развития, коррелируя с активностью гемопоэза.

5. Реализация потенциал МСК к дифференцировке *in vivo* зависит не только от органной принадлежности клеток, но и от условий микроокружения. В составе тканевого фрагмента, трансплантированного в почку, МСК из печени зародышей дифференцируются в хондрогенном направлении, тогда как в диффузионных камерах со взвесью свежевыделенных клеток – в остеогенном. Некультивированные МСК костного мозга формируют в диффузионных камерах кость, хрящ и кроветворную строму. После выделения МСК в культуру их способность к последующей дифференцировке в диффузионных камерах сохраняется у клеток из костного мозга, но теряется у клеток из зародышевой печени.

6. МСК из зрелого костного мозга и зародышевой печени гетерогенны по чувствительности к 5-фторурацилу. Резистентные к нему клетки обоих органов имеют пониженный пролиферативный потенциал. В костном мозге они теряют остеогенные потенциалы в ходе пассирования быстрее, а в печени зародыша – медленнее, чем чувствительные к 5-фторурацилу клетки. Выявленные органотипические особенности в темпе изменения остеогенных потенциалов свидетельствуют о разном содержании зрелых клеток в устойчивых к 5-фторурацилу субпопуляциях МСК.

7. Выявлены различия в адгезивных свойствах МСК зрелого костного мозга и зародышевой печени: последние более адгезивны к пластику и белкам внеклеточного матрикса. Культивирование МСК обоих органов на фибронектине или коллагене I типа по сравнению с пластиком не повышает число КОЕ-Ф, прикрепившихся за первые 7 суток, но снижает эффективность клонирования КОЕ-Ф, не прикрепившихся за этот срок. Впервые показано, что взаимодействие с фибронектином (через домен, связывающийся с клеткой) ослабляет остеогенные потенциалы МСК костного мозга. Коллаген I типа и в меньшей степени фибронектин подавляют их адипогенную дифференцировку.

На основании полученных результатов выдвинута концепция созревания кроветворной ниши в индивидуальном развитии организма путем приобретения МСК компетентности к дифференцировке в ее специализированные клеточные компоненты.

Список основных публикаций по теме диссертации

1.* **Паюшина О. В.**, Буеверова Э. И., Сатдыкова Г. П., Старостин В. И., Домарацкая Е. И., Хрущов Н. Г. Сравнительное исследование мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и эмбриональной печени мыши и крысы // Известия РАН. Серия биол. – 2004. – № 6. – С. 659–664.

2.* **Паюшина О. В.**, Домарацкая Е. И., Старостин В. И. Мезенхимные стволовые клетки, их источники, фенотип и потенции к дифференцировке // Известия РАН. Серия биол. – 2006 (а). – № 1. – С. 6–25.

3.* **Паюшина О. В.**, Домарацкая Е. И., Буеверова Э. И., Никонова Т. М., Буторина Н. Н. Молчанова Е. А., Старостин В. И. Анализ чувствительности родоначальных клеток стромы (КОЕ-Ф) костного мозга и эмбриональной печени крысы к 5-фторурацилу // Известия РАН. Серия биол. – 2006 (б). – № 6. – С. 660–666.

4.* Домарацкая Е. И., **Паюшина О. В.**, Старостин В. И. Стволовые клетки и проблемы дифференцировки // Природа. – 2007. – № 10. – С. 8–18.

5.* Молчанова Е. А., **Паюшина О. В.**, Старостин В. И. Влияние факторов роста на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга // Известия РАН. Серия биол. – 2008. – № 6. – С. 645–662.

6.* Кожевникова М. Н., Микаелян А. С. **Паюшина О. В.**, Старостин В. И. Сравнительная характеристика мезенхимных стромальных клеток из костного мозга крысы на ранних и поздних этапах культивирования // Известия РАН. Серия биол. – 2008. – № 2. – С. 156–162.

7.* **Паюшина О. В.**, Хныкова О. Н., Буторина Н. Н., Кожевникова М. Н., Старостин В. И. Спонтанный миогенез в первичной культуре эмбриональной печени крысы // Доклады Академии наук. – 2009 (а). – Т. 425. – № 1. – С. 120–122.

8. **Паюшина О. В.**, Старостин В. И., Хрущов Н. Г. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки: характеристика, потенции к дифференцировке и перспективы клинического использования // В кн.: Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Под ред. М.А. Пальцева. Москва. «Медицина» «Шико». – 2009 (б). – Т. 2. – С. 100–123.

9.* **Паюшина О. В.**, Хныкова О. Н., Буторина Н. Н., Буеверова Э. И., Минин А. А., Старостин В. И. Влияние первичных адгезивных взаимодействий с фибронектином на клональный рост и остеогенные потенции мезенхимных стромальных клеток крысы // Цитология. – 2010. – Т. 52. – № 4. – С. 326–333.

10. Хныкова О. Н., **Паюшина О. В.**, Буторина Н. Н., Буеверова Э. И., Старостин В. И. Влияние компонентов внеклеточного матрикса на клональный рост и остеогенную дифференцировку мезенхимных стромальных клеток крысы // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. – 2010. – Вып. 25. – С. 37–47.

11.* Шевелева О. Н., **Паюшина О. В.**, Кожевникова М. Н., Буторина Н. Н., Старостин В. И. Спонтанный и индуцированный миогенез при культивировании клеток из печени зародышей крысы // Цитология. – 2011. – Т. 53. – № 11. – С. 874–883.

12.* **Паюшина О. В.**, Буторина Н. Н., Никонова Т. М., Кожевникова М. Н., Шевелева О. Н., Старостин В. И. Сравнительное исследование клонального

роста и дифференцировки мезенхимных стромальных клеток из печени зародышей крысы на разных сроках пренатального развития // Цитология. – 2011. – Т. 53. – № 11. – С. 859–867.

13.* Шевелева О. Н., Паюшина О. В., Старостин В. И. Клеточные и молекулярные основы гистогенеза скелетных мышц // Известия РАН. Серия биол. – 2012. – № 6. – С. 579–588.

14.* Паюшина О. В., Домарацкая Е. И., Старостин В. И. Клеточный состав и регуляторные функции стромы зародышевой печени // Цитология. – 2012. – Т. 54. – № 5. – С. 369–380.

15.* Паюшина О. В., Буторина Н. Н., Шевелева О. Н., Кожевникова М. Н., Старостин В. И. Клеточный состав первичной культуры зародышевой печени // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 4. – С. 224–232.

16. Payushina O. V. Hematopoietic microenvironment in the fetal liver: Roles of different cell populations // ISRN Cell Biology. – 2012. – V. 2012. – doi:10.5402/2012/979480.

17. Паюшина О. В., Буторина Н. Н., Шевелева О. Н., Старостин В. И. Сравнительная характеристика культур стромальных клеток из кроветворных органов крысы на разных стадиях онтогенеза // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. – 2013. – Вып. 29. – С. 13–22.

18.* Паюшина О. В., Буторина Н. Н., Шевелева О. Н., Бухинник С. С., Старостин В. И. Мезенхимальные стромальные клетки селезенки крысы в пре- и постнатальном онтогенезе: сравнительный анализ клонального роста, фенотипа и потенциалов к дифференцировке // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – № 4. – С. 223–230.

19.* Паюшина О. В., Буторина Н. Н., Шевелева О. Н., Бухинник С. С., Домарацкая Е. И. Клональный рост, фенотип и потенциалы к дифференцировке мезенхимных стромальных клеток из кости плодов крысы // Доклады Академии наук. – 2013. – Т. 453. – № 5. – С. 574–576.

20. Паюшина О. В., Бухинник С. С., Буторина Н. Н., Шевелева Н. Н., Домарацкая Е. И. Сравнительная характеристика мезенхимных стромальных клеток из кроветворных органов в пренатальном и раннем постнатальном онтогенезе. Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология — от науки к практике». Уфа, 2014 // Сборник материалов конференции. – 2014. – Т. 2. – С. 61–64.

21*. Паюшина О. В., Домарацкая Е. И. Гетерогенность и возможная структура популяции мезенхимных стромальных клеток // Цитология. – 2015. – Т. 57. – № 1. – С. 31–38.

* - статьи опубликованы в журналах, рекомендуемых ВАК РФ.