

УДК: 602.9

Морфология, кинетика роста и фенотип мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека

М.М. Зафранская, Н.В. Ламовская, Д.Б. Нижегородова, М.Ю. Юркевич, С.С. Багатка, С.Ю. Мечковский, Г.И. Иванчик, Г.Я. Хулуп

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Morphology, growth kinetics and cell phenotype of bone marrow- and adipose tissue- derived mesenchymal stem cells

M.M. Zafranskaya, N.V. Lamouskaya, D.B. Nizheharodava, M.Yu. Yurkevich, S.S. Bagatka, S.Yu. Mechkovsky, G.I. Ivanchik, G.Y. Khulup

Belarussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Аннотация

Целью исследования явилось сравнение морфологии, динамики роста и клеточного фенотипа мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) человека. Результаты были получены при использовании методов проточной цитометрии, световой микроскопии и культуральных исследований.

Показано, что МСК КМ и ЖТ имеют сходную фибробласто-подобную морфологию, характерный фенотип CD90+CD105+CD44+CD119+CD34-CD45-CD31-CD14- и аналогичную пролиферативную активность. Тем не менее, использование ЖТ позволяет получать значительно большие количества клеточного материала за более короткий период времени.

МСК экспрессируют ряд молекул, принимающих участие в иммунных реакциях и ангиогенезе, что указывает на возможную роль МСК в указанных процессах и подтверждает перспективность их использования в качестве иммуномодулирующих и ангиогенных агентов.

Ключевые слова

Мезенхимальные стволовые клетки, костный мозг, жировая ткань, морфология, кинетика роста, фенотип.

Генетическая стабильность, пролиферативный и дифференцировочный потенциал, способность к миграции в область повреждения ткани, иммуномодулирующие свойства и отработанные протоколы выделения и куль-

Summary

The aim of research was to compare morphology, growth kinetics and cell phenotype of bone marrow- and adipose tissue- derived mesenchymal stem cells (bmMSCs and aMSCs). Results were obtained using methods of flow cytometry, light microscopy and cell culturing.

It was shown that bmMSCs and aMSCs have similar fibroblast-like morphology, typical phenotype CD90+CD105+CD44+CD119+CD34-CD45-CD31-CD14- and analogous proliferative activity. Nevertheless, using adipose tissue as a source of MSCs allows obtaining larger quantities of cells within a shorter time period.

MSCs express molecules, which take part in immune reactions and angiogenesis, indicating the potential role of MSCs in these processes and confirming the possibility of using MSCs as immunoregulatory and angiogenic agents.

Key words

Mesenchymal stem cells, bone marrow, adipose tissue, morphology, growth kinetics, phenotype.

тивирования являются основными преимуществами для успешного использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в клеточной терапии [1]. Одной из актуальных задач в данной области исследования являет-

ся поиск оптимального источника получения стволовых клеток.

Костный мозг (КМ) является наиболее широко используемым источником МСК [2]. Клетки с подобными свойствами могут быть получены также из жировой ткани (ЖТ) [3]. Преимуществом жировой ткани является меньшая инвазивность процедуры забора и возможность получения значительного количества биологического материала для выделения МСК. Однако, ряд авторов указывают на наличие различий в характеристиках стволовых клеток, выделяемых из разных типов тканей [4,5].

Целью данного исследования явилось изучение и сравнение морфологии, динамики роста и клеточного фенотипа МСК КМ и ЖТ человека для решения вопроса возможности использования альтернативного источника получения стволовых клеток.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили МСК, выделенные из КМ (n=12) и ЖТ (n=10) человека.

Выделение и культивирование МСК. Для получения МСК КМ мононуклеары, полученные путем центрифугирования пунктата КМ на градиенте плотности, засеивали в культуральные чашки в питательной среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 2 мМ L-глутамин, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл неомидина (полная питательная среда) в концентрации $1-8 \times 10^5$ ядросодержащих клеток (ЯСК) на 1 см^2 поверхности культурального пластика. Замену среды проводили через 24 часа после посева, а в дальнейшем – каждые третьи-четвертые сутки. По достижении культурами 80-90% конfluence, клетки пересеивали для получения 1-го-3-го пассажей.

Для выделения МСК ЖТ, гомогенизированную ЖТ, полученную при операции липосакции или абдоминопластики, инкубировали в течение 45 минут с 0,075% раствором коллагеназы I типа при 37°C . Клетки отмывали дважды центрифугированием, и клеточный осадок засеивали в культуральные чашки в концентрации $1-7 \times 10^4$ ЯСК/ см^2 [3]. Замену среды и пересевы осуществляли по выше описанной методике.

Число удвоений популяций для каждого пассажа, начиная с 1-го, рассчитывали по формуле $x = [\log_{10}(N_K) - \log_{10}(N_{\Pi})] / \log_{10}(2)$ [5], где N_K – коли-

чество полученных клеток конfluence культуры, N_{Π} – количество посеянных клеток.

Культуры исследовали с использованием инвертированного микроскопа Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия).

Оценка пластичности мезенхимальных стволовых клеток. Для подтверждения пластичности МСК ЖТ и КМ проводили их дифференцировку в адипо- и остеогенном направлениях.

Для адипогенной дифференцировки конfluence культуры МСК культивировали в полной питательной среде с добавлением 10^{-7} М дексаметазона, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 50 мкг/мл индометацина, для остеогенной – 10^{-8} М дексаметазона, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10 мМ бета-глицерофосфата. По истечении 4-х недель культуры окрашивали соответственно Oil Red O для выявления липидов или нитратом серебра по Ван Косса для выявления минерализованного внеклеточного матрикса [6].

Проточная цитометрия. Для изучения экспрессии поверхностных и внутриклеточных маркеров культурами МСК использовались мышиные моноклональные антитела (МАТ) к антигенам CD90-FITC, CD105-PE, CD44-FITC, CD34-APC, CD45-PC7, CD31-FITC/PE, CD14-PE, CD119-PE (Beckman Coulter, США), рецептору сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR2-APC), хемокиновому рецептору 7 типа (CCR7-PE) (R&D Systems, Канада), эндотелиальной синтазе оксида азота (eNOS-PE) (BD Biosciences, США) и фактору Виллебранда (vWF) (Beckman Coulter, США). Пробы с МАТ к vWF дополнительно инкубировали со вторичными антителами к мышиному иммуноглобулину G, конъюгированными с FITC (Sigma, Германия).

Измерения проводили с использованием проточного цитометра FC 500 (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка результатов исследования. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (25-й – 75-й процентиля)). Статистическая значимость различий между группами определялась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Морфология культур МСК. Первичные культуры адгезивных клеток КМ и ЖТ человека характеризовались морфологической гетерогенностью, более выраженной в культурах, полученных из КМ. Так, в культурах клеток КМ в течение нескольких суток после посева можно было наблюдать значительное количество прикрепленных округлых неделящихся клеток, наряду с отдельными колониями веретеновидных фибробластоподобных клеток, которые в последующем покрывали всю поверхность культурального пластика (Рис.1). В культурах клеток ЖТ в течение первых 3-4-х суток после посева наряду с фибробласто-подобными клетками, можно было наблюдать полигональные клетки с вакуолями в цитоплазме. К 5-м суткам

культивирования в первичной культуре, полученной из ЖТ, клетки имели преимущественно фибробласто-подобную морфологию, характерную для МСК.

Начиная с 1-го пассажа, МСК КМ и ЖТ были морфологически неразличимы и представляли гомогенные культуры клеток, характеризующихся веретеновидной фибробласто-подобной морфологией с четко различимым ядром, ядрышками и цитоплазматической перинуклеарной зернистостью, что может указывать на выраженную секреторную активность этих клеток (Рис.1В, 2).

Динамика роста и пролиферативная активность МСК. Количество ЯСК, выделяемых из 1 мл образцов КМ и ЖТ с использованием описанных методик, достоверно не отличалось, варьировало в зависимости от донора

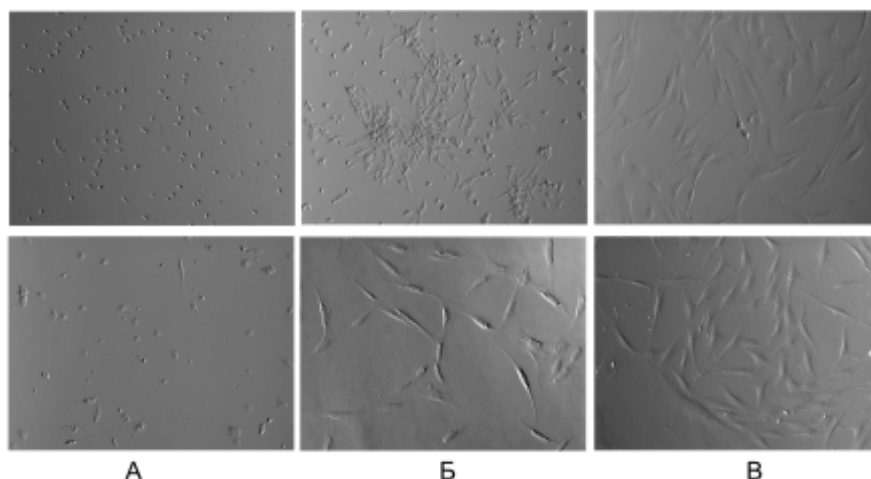


Рис. 1. Морфология МСК КМ (вверху) и ЖТ (внизу) человека, ув. 100:
А – первичная культура (2 сут.); Б – первичная культура (5-6 сут.); В – 1-й пассаж (5-6 сут.)

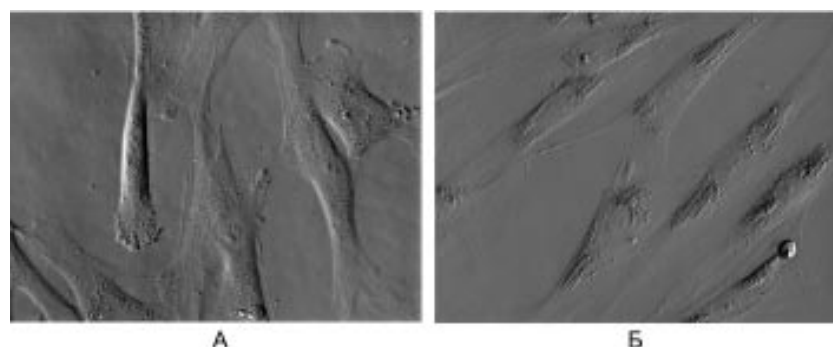


Рис. 2. Морфология МСК КМ (А) и ЖТ (Б) человека, 1-й пассаж, ув.400

и составило соответственно 245 (144 - 358) и 144 (97 - 225) ($p=0,12$).

Характеристики роста первичных культур и первых трех пассажей МСК КМ и ЖТ (время достижения конfluence и число удвоений популяции в течение одного пассажа) представлены в таблице 1.

Установлено, что первичная культура МСК ЖТ достигала конfluence, в среднем, к 15-м суткам, в то время как первичная культура МСК КМ - к 30-м суткам ($p<0,001$). При культивировании в течение последующих трех пассажей время достижения конfluence культурами МСК ЖТ и КМ не имело статистически значимых различий. Полученные данные подтверждаются отсутствием статистически значимых различий между изучаемыми группами по среднему числу удвоений популяции в течение 1-го - 3-го пассажей, что указывает на аналогичную пролиферативную активность МСК КМ и ЖТ.

Использование МСК в клеточной терапии предполагает использование трансплантатов с достаточной клеточностью. С практической точки зрения важным является сравнение возможности быстрого и экономичного наращивания МСК при получении их из КМ и ЖТ. Для этого нами было подсчитано количество клеток, получаемое из 1 мл исходного биологического материала (КМ или ЖТ) к концу первичной культуры и первых трех пассажей (Рис. 3). Количество клеток первичной культуры, получаемых из 1 мл ЖТ, достоверно превышало аналогичный показатель для КМ. Данная закономерность сохранялась и на уровне последующих 3-х пассажей, однако статистически значимые различия отсутствовали на 2-м и 3-ем пассажах, что может быть обусловлено значительной вариабельностью описываемого показателя (Рис. 3).

Таким образом, использование ЖТ в качестве источника МСК позволяет получать

Таблица 1. Характеристики роста культур МСК

Культура	Пассаж	Время достижения конfluence, сутки	Число удвоений популяции, раз
МСК КМ	0	30 (27 - 32)	-
	1	18 (13 - 28)	1,5 (0,94 - 2,23)
	2	21 (15 - 22)	2,36 (1,1 - 3)
	3	15 (13 - 18)	2,24 (1,36 - 2,93)
МСК ЖТ	0	15 (13 - 21)***	-
	1	14 (13 - 18)	1,96 (1,4 - 2,52)
	2	16 (12 - 17)	2,72 (1,79 - 3,04)
	3	16 (12,5 - 18)	3,16 (2,74 - 3,2)

Примечание: *** – различия статистически значимы по сравнению с МСК КМ, $p<0,001$

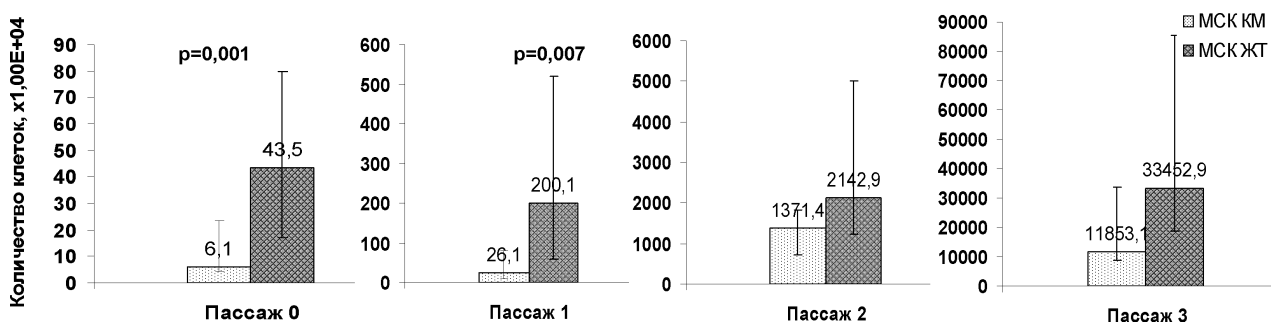


Рис. 3. Количество МСК первичной культуры и первых трех пассажей, получаемых из 1 мл исходного биологического материала (КМ и ЖТ), $\times 10^4$

большее количество клеток первичной культуры и 1-го пассажа, что может быть обусловлено большим содержанием КОЕ-Ф в структуре ЯСК ЖТ [5].

Пластичность МСК. Культивирование МСК КМ и ЖТ в адипогенной среде приводило к появлению клеток с крупными вакуолями в цитоплазме, занимавшими все пространство в клетке, которые можно было наблюдать уже через одну неделю культивирования. В течение последующих 3-х недель количество адипоцитов в культурах увеличивалось. Наличие липидных включений подтверждалось положительной окраской Oil Red O через 4 недели культивирования. При культивировании в остеогенной среде в культурах МСК наблюдалось формирование многослойных узлов и формирование кальций-содержащего матрикса, подтверждаемое окраской нитратом серебра по Ван Косса через 4 недели культивирования (Рис.4).

Характеристика фенотипа МСК. Фенотипическая характеристика культур МСК ЖТ и КМ человека представлена в таблице 2. Следует отметить, что в первичных культурах адгезивных клеток, полученных из КМ и ЖТ, наряду с экспрессией типичных для МСК маркеров CD90, CD105, CD44, часть клеток имели

на своей поверхности маркеры гемопоэтических и эндотелиальных клеток CD34, CD31, CD45, экспрессия которых снижалась по мере пассирования клеточных культур МСК как ЖТ, так и КМ. При этом в первичной культуре, полученной из ЖТ, определялось больше клеток, экспрессировавших CD34 ($p=0,017$), и меньше клеток, экспрессировавших CD45 ($p=0,048$), чем в первичной культуре, полученной из КМ. По экспрессии остальных изучаемых маркеров первичные культуры адгезивных клеток КМ и ЖТ не имели статистически значимых различий.

Сравнение экспрессии фенотипических маркеров 1-м – 3-м пассажами МСК КМ и ЖТ показало, что культуры, полученные из обоих источников, фенотипически идентичны. Как для культур МСК ЖТ, так и КМ, не характерны антигены CD31, CD34, CD45. Наиболее стабильными маркерами МСК при пассировании являются молекулы CD90, CD105, CD44 и CD119, экспрессия которых сохраняется на высоком уровне на протяжении 3-х анализируемых пассажей. Репрезентативные гистограммы экспрессии клеточных маркеров культурами МСК КМ и ЖТ представлены на рисунке 5.

В настоящее время в качестве перспективных свойств МСК рассматриваются их имму-

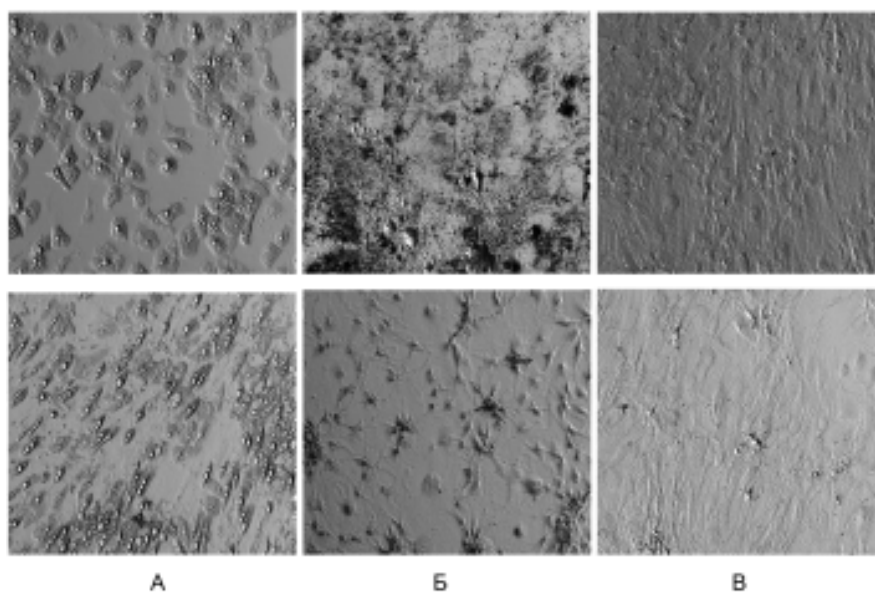


Рис. 4. Направленная дифференцировка МСК КМ (вверху) и ЖТ (внизу) в адипо- и остеогенном направлениях, ув. 100: А – адипогенная дифференцировка; Б – остеогенная дифференцировка (окраска нитратом серебра); В – контроль

Таблица 2. Экспрессия поверхностных маркеров МСК КМ и ЖТ, %

Культура/ Маркер	МСК КМ			МСК ЖТ		
	Пассаж 0	Пассаж 1	Пассаж 2-3	Пассаж 0	Пассаж 1	Пассаж 2-3
CD 90	95,3 (88,2-98,2)	99,3 (98,1-99,6)	99,8 (99,6-99,9)	97,9 (96,4-98,6)	99,5 (99,4-99,7)	99,6 (98,9-99,8)
CD 105	92,2 (85,8-98,5)	99,6 (98,4-99,6)	99,9 (96,9-99,9)	98,9 (98,8-99,2)	99,5 (99,2-99,7)	99,8 (99,1-99,9)
CD 44	88,7 (84,4-93,4)	98,5 (96,3-99,0)	98,6 (88,5-99,9)	96,7 (41,8-97,0)	98,8 (97,9-99,7)	99,8 (98,9-99,9)
CD 31	5,7 (2,2-15,3)	3,7 (2,2-6,0)	0,4 (0,2-0,6)	3,8 (1,1-6,5)	1,9 (1,1-5,0)	0,7 (0,3-1,2)
CD 34	2,6 (0,3-4,3)	0,3 (0,2-0,7)	0,1 (0,0-0,1)	9,9 (8,7-14,2)*	1,2 (0,4-3,3)	0,2 (0,1-3,6)
CD 45	6,0 (2,8-15,2)	0,5 (0,5-1,8)	0,9 (0,2-1,4)	0,3 (0,1-2,3)*	0,5 (0,3-2,0)	1,3 (0,4-1,3)
CD 14	4,0 (3,3-19,8)	3,4 (2,2-6,4)	0,5 (0,3-1,2)	0,2 (0,1-0,3)	0,3 (0,1-0,4)	НД
CD 119	99,3 (98,5-99,4)	98,5 (97,6-99,3)	97,7 (95,7-97,9)	92,3 (85,2-99,3)	99,3 (98,8-99,5)	99,7 (97,4-99,8)
CCR7	88,7 (87,7-91,0)	51,8 (50,0-58,1)	4,6 (2,2-14,3)	90,7 (88,6-92,8)	85,9 (81,3-90,5)	44,3 (34,9-99,9)

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с МСК КМ, $p < 0,05$;
НД – нет данных.

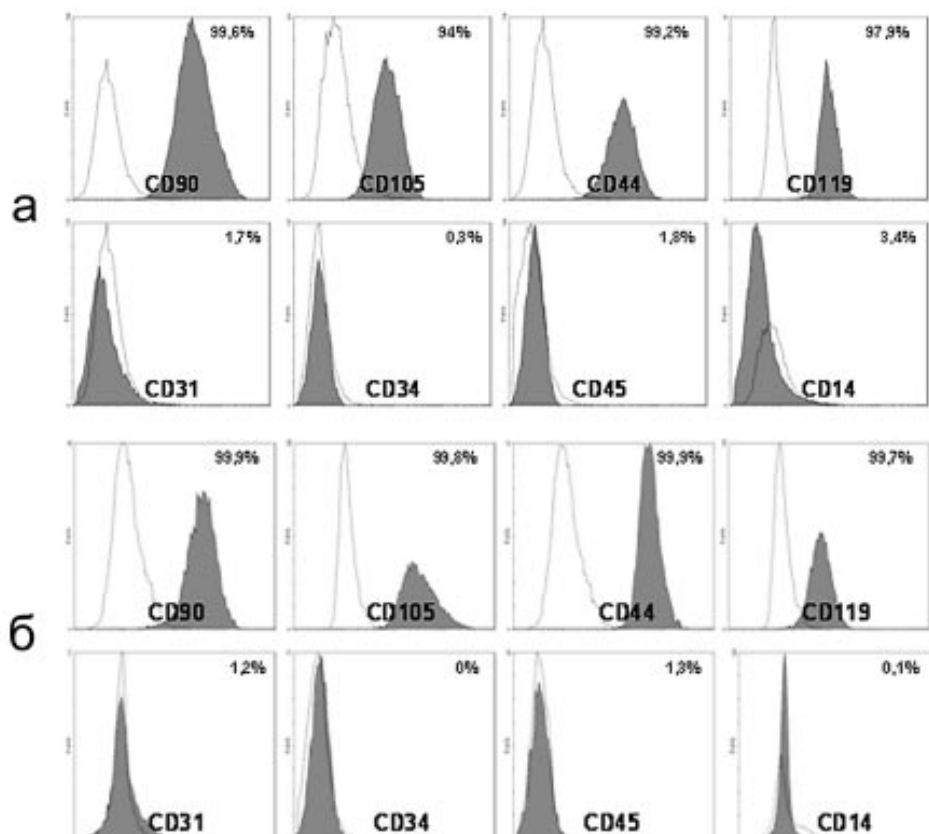


Рис. 5. Репрезентативные гистограммы экспрессии клеточных маркеров культурами МСК КМ (а) и ЖТ (б).

Примечание: прозрачные гистограммы – отрицательный контроль (без первичных антител).

норегуляторное действие и ангиогенная активность. Механизмы, лежащие в основе указанных эффектов, изучены недостаточно. В связи с этим представляет интерес изучение экспрессии на МСК рецепторов цитокинов, хемокинов и факторов роста, принимающих участие в иммунном ответе и ангиогенезе, а также эндотелиальных маркеров.

В отличие от более ранних исследований, продемонстрировавших низкие уровни экспрессии МСК КМ маркера CD119 (рецептор γ IFN) [7], нами выявлен данный маркер на поверхности большинства клеток в культурах, полученных из обоих источников.

Значительный процент клеток первичной культуры, полученной из КМ и ЖТ, экспрессировал также С-С хемокиновый рецептор типа 7 (CCR7) (Рис. 6). Однако, при пересевах количество клеток, несущих данный рецептор, уменьшалось как в культурах МСК КМ, так и ЖТ. Полученные результаты частично согласуются с данными Nonczarenko М. и соавт., показавшими, что МСК КМ 2 пассажа гомогенно экспрессируют CCR7 (68%), однако, при длительном культивировании его экспрессия значительно снижается [8]. Снижение экспрессии данного маркера при пересевах может обуславливать уменьшение миграционной способности МСК при пассировании.

Анализ экспрессии эндотелиальных маркеров мезенхимальными стволовыми клетками показал, что наряду с отсутствием CD31, для

МСК не характерна экспрессия таких молекул, как эндотелиальная синтаза оксида азота и VEGFR2 (Рис. 6). В то же время, как МСК КМ, так и МСК ЖТ, характеризуются экспрессией CD105, CD44 и фактора Виллебранда, обнаруживаемых также на эндотелиальных клетках.

Заключение

Таким образом, несмотря на наличие значительного количества исследований, посвященных анализу клеточного фенотипа МСК, не существует общепринятых критериев иммунофенотипической характеристики этих клеток. Нами показано, что в первичных культурах, полученных из КМ и ЖТ, имеется примесь клеток, экспрессирующих нехарактерные для МСК маркеры, и для получения гомогенной культуры с характерным фенотипом необходимо пассирование МСК.

Начиная с 1-го пассажа, МСК КМ и ЖТ имеют сходную фибробласто-подобную морфологию и характерный клеточный фенотип CD90+CD105+CD44+CD119+CD34-CD45-CD31-CD14-.

Культуры, полученные из обоих источников, обладают аналогичной пролиферативной активностью, которая не снижается в течение первых трех пассажей. Тем не менее, использование ЖТ позволяет получать значительно большие количества клеточного материала первичной культуры и первого пассажа за более короткий период времени, что харак-

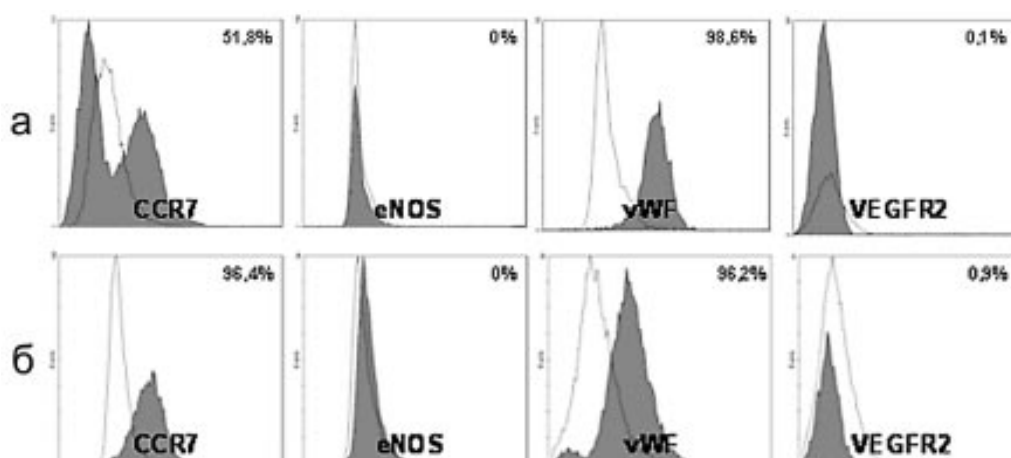


Рис. 6. Репрезентативные гистограммы экспрессии маркеров CCR7, eNOS, vWF и VEGFR2 культурами МСК КМ (а) и ЖТ (б).

Примечание: прозрачные гистограммы – отрицательный контроль (без первичных антител).

теризует ЖТ как альтернативный источник с точки зрения быстрого и экономичного наращивания МСК.

МСК экспрессируют ряд молекул, принимающих участие в иммунных реакциях, ангиогенезе и поддержании сосудистого гомеостаза, что указывает на возможную роль МСК в указанных процессах и подтверждает перспективность их использования в качестве иммуномодулирующих и ангиогенных агентов.

незе и поддержании сосудистого гомеостаза, что указывает на возможную роль МСК в указанных процессах и подтверждает перспективность их использования в качестве иммуномодулирующих и ангиогенных агентов.

Литература

1. Newman R.E., Yoo D., LeRoux M.A. Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells. *Inflammation & Allergy – Drug Targets*. 2009; 8: 110–123.
2. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143–147.
3. Zuk P.A., Zhu, M., Mizuno, H. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*. 2001; 7(2): 211–228.
4. Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K. Muneta T. et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis&Rheumatism*. 2005; 52: 2521–2529.
5. Kern S., Eichler H., Stoeve J. Кӓтер Н, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006; 24: 1294–1301.
6. Shim W.S., Jiang S., Wong P. et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(2): 481–488.
7. Lee H.J., Choi B.H., Min B.H. Park S.R. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. *Arthritis Rheum* 2009; 60(8): 2325–2332.
8. Honczarenko M., Le Y., Swierkowski M., Ghiran I., Glodek A.M., Silberstein L.E. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 2006; 24(4): 1030–1041.

Сведения об авторах:

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, Минская обл., Минский район, п. Лесной, 31. (Центральная научно-исследовательская лаборатория БелМАПО). Ламовской Натальи Владимировне.

E-mail: natkhrpach@tut.by

Тел. раб. 265-33-56, моб. 8-029-758-91-48

Факс. 265-46-43

Поступила 1.06.2010 г.