



В. Г. БОГДАН, М. М. ЗАФРАНСКАЯ, С. С. БАГАТКА,
М. Ю. ЮРКЕВИЧ, Ю. М. ГАИН, Ю. Е. ДЕМИДЧИК

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ В ФИБРОБЛАСТНОМ НАПРАВЛЕНИИ

Белорусский государственный медицинский университет,
Белорусская медицинская академия последипломного
образования

Цель исследования. Разработать способ дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) человека в фибробластном направлении с изменением функционального состояния клеток и оценкой возможности их применения в составе биологического трансплантата.

Материал и методы. Культуры МСК ЖТ 5 пациентов с послеоперационными вентральными грыжами больших размеров. Использовались культуральные методы, проточная цитометрия, микроскопия, иммуноцитохимический, иммуноферментный анализ, обратная транскриптазная полимеразная цепная реакция, количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени, статистический анализ.

Результаты. Культивирование МСК ЖТ в присутствии коктейля факторов роста (FGF β , EGF, TGF β 1, TGF β 3 и 0,9% человеческой сыворотки) приводит к изменению функциональных свойств клеток в виде достоверного роста уровня экспрессии мРНК коллагена III типа и матриксной металлопротеиназы I типа и высокой способности к продукции сосудистого эндотелиального фактора роста. Разработанный способ дифференцировки позволяет сократить время культивирования и получить равномерный активный рост клеточной культуры. Выявлено, что более интенсивное окрашивание на специфические маркеры фибробластов (внутриклеточный маркер фибробластов и коллаген III типа) клеток, культивируемых в дифференцировочных условиях, происходит за счет более высокой плотности клеточных культур. Установлено изменение фенотипа полученной в процессе дифференцировки клеточной культуры за счет значительного снижения (на 89,7%) основного маркера МСК ЖТ CD90, уменьшения интенсивности флуоресценции моноклональных антител CD105, CD44 и с CD119^{high} до CD119^{low} с сохранением высокой клеточной миграционной способности МСК ЖТ по уровню маркера CCR7.

Заключение. Дифференцировка в фибробластном направлении по разработанному способу приводит к изменению функционального состояния МСК ЖТ, которые могут быть использованы в составе биологического трансплантата в качестве клеточных активаторов для улучшения метаболизма и структуры синтезируемой *in vivo* соединительной ткани.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, дифференцировка, коллаген, матриксная металлопротеиназа.

В настоящее время все многообразие основных клеток соединительной ткани принято обозначать термином «фибробластический дифферон», который трактуется как сложная система клеток одной гистогенетической детерминации от наименее до терминально дифференцированной, причем по мере дифференцировки изменяются морфофункциональные свойства

[1—3]. Фибробластический дифферон включает в себя адипоциты, фиброкласты, фиброциты, дифференцированные фибробласты, юные фибробласты, префибробласты, миофибробласты, периваскулярные клетки и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [2, 3]. Именно поэтому клеточный состав разрабатываемого биологического трансплантата должен максимально соответствовать естественной структуре соединительной ткани.

Успехи современных медицинских клеточных технологий напрямую связаны с использованием культивируемых *in vitro* алло- и аутологичных фибробластов. Наиболее многочисленные экспериментальные и клинические исследования посвящены использованию культур фибробластов для ликвидации дефектов кожных покровов, полученных вследствие ожогов, травм, трофических нарушений как самостоятельно, так и в сочетании с кератиноцитами в составе сложных двух- или трехмерных носителей, в том числе и в виде коммерческих препаратов [4, 5]. Кроме того, имеются работы, изучающие применение фибробластов в урологии, нейрохирургии, стоматологии, сердечно-сосудистой и челюстно-лицевой хирургии [4—6]. Однако во всех перечисленных исследованиях используются культуры дифференцированных фибробластов, изменение функциональных свойств которых в принципе невозможно. Перспективным и ранее не изученным аспектом одной из сфер биотехнологии — тканевой инженерии, является исследование свойств стволовых клеток (с возможным изменением их функциональных характеристик) с целью дальнейшего использования для замещения ранее утраченных тканей, в частности, для реконструкции обширных дефектов передней брюшной стенки при послеоперационных вентральных грыжах. Наиболее востребованными для этих целей являются МСК жировой ткани (ЖТ), к преимуществам которой можно отнести малоинвазивный способ забора материала, низкую контаминированность другими видами клеток, большой выход клеток при выделении [7, 8].

Установлено, что направленная дифференцировка в фибробласты МСК костного мозга инициируется в присутствии ростовых факторов, агонистов их рецепторов или в различных дифференцировочных коктейлях [9—12]. В то же время исследования по дифференцировке МСК ЖТ в фибробластном направлении ранее не выполнялись.

Существующие способы дифференцировки предполагают использование в составе дифференцировочной среды сыворотки животного происхождения и различных ростовых факторов (стимуляторов) и обладают определенными недостатками: а) низкий пролиферативный потенциал и гибель некоторого количества клеток в процессе дифференцировки; б) неравномерный рост клеточной культуры в предлагаемой пролиферативной и дифференцировочной среде в итоге приводит к снижению плотности клеток в культуре; в) существующая антигенная нагрузка (в про-

цессе применения культуры фибробластов для трансплантации) при использовании эмбриональной телячьей сыворотки; г) отсутствие сведений об изменении функционального состояния МСК ЖТ после дифференцировки для активации процессов ремоделирования соединительной ткани в зоне пластики.

Цель исследования — оценить возможность использования МСК ЖТ человека, дифференцированных в фибробластном направлении, в составе биологического трансплантата.

Материал и методы

Материалом исследования служили МСК, выделенные из ЖТ 5 пациентов с послеоперационными вентральными грыжами больших размеров. Процедура забора биологического материала одобрена этическим комитетом УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н. Е. Савченко». Все пациенты подписали информированное согласие на предоставление биологического материала, а также использование полученной в результате исследований информации для научных отчетов, статей, докладов, диссертационных работ.

Для выделения МСК ЖТ гомогенизированную ЖТ промывали стерильным раствором Хенкса и инкубировали в течение 45 мин с 0,075% раствором коллагеназы I типа (Sigma) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 37°C. Нейтрализацию фермента проводили равным объемом ФСБ, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (НИИ ЭИМ, РБ). Полученные в результате обработки коллагеназой клетки отмывали 2 раза центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM с пониженным содержанием глюкозы — 1000 мг/мл («Sigma», США), добавляли 10% ЭТС, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 ммоль L-глутамин и высевали в концентрации 5×10^4 клеток на 1 см^2 в культуральные чашки диаметром 60 мм [10]. Через 24 ч проводили смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток. В дальнейшем смену среды осуществляли каждые 4-е сутки. По достижении культурами $\approx 75\%$ конfluenceности клетки снимали с поверхности культурального пластика с помощью 0,25% раствора трипсина/ЭДТА, затем трипсин ингибировали с помощью ФСБ, содержащего 10% ЭТС; после двукратного отмывания центрифугированием клетки засеивали в культуральные чашки в концентрации 1×10^4 клеток на 1 см^2 .

Принятым в ходе исследования за прототип является способ, включающий предварительное культивирование МСК ЖТ в пролиферативной среде, содержащей 10% ЭТС, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 ммоль L-глутамин, с последующей заменой при достижении культурами конfluenceности пролиферативной среды на дифференцировочную, состоящую из 0,9% ЭТС и коктейля ростовых факторов (10 нг/мл FGF β , 10 нг/мл EGF, 10 нг/мл TGF β 1), и снятие с культурального пластика полученного моно слоя культуры фибробластов путем дополнительной ферментативной обработки [12].

Разработанный способ направленной дифференцировки МСК ЖТ человека в фибробласты отличает-

ся тем, что в дифференцировочную среду дополнительно включают 5 нг/мл TGF β 3 и 0,9% человеческую сыворотку (уведомление о положительном результате предварительной экспертизы патента Республики Беларусь на изобретение № а20110183 от 27.04.2011).

Микроскопия и мониторинг клеточных культур. Культуры исследовали на универсальных инвертированных микроскопах «Micros» (Австрия) и «Carl Zeiss Axiovert 200» (Германия) с применением методов светлого поля, бокового освещения, фазового и Varel-контрастов, эпифлюоресценции (окраска Хекстом 33342/пропидий йодидом).

Фенотипирование клеточных культур методом проточной цитометрии. Для изучения экспрессии поверхностных маркеров культурами МСК человека использовали мышинные моноклональные антитела (МАТ) к антигенам CD90-FITC, CD71-FITC, CD44-FITC, CD31-FITC/PE, CD105-PE, HLA-DR-PE, CD119-PE, CD34-APC, CD45-PC7 («Beckman Coulter», США), CCR7-PE («R&D Systems», Канада). Клетки в концентрации 1×10^5 кл./200 мкл ФСБ инкубировали с моноклональными антителами в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Измерения проводили с использованием проточного цитометра FC 500 («Beckman Coulter»).

Иммуноцитохимический метод окрашивания клеток. Клетки тщательно отмывали в ФСБ и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами: мышинными МАТ к внутриклеточному (5B5) маркеру фибробластов («Abcam», Англия), коллагену III типа («Beckman Coulter»). Визуализацию образовавшихся комплексов «антиген—антитело» проводили с использованием набора LSAB+System-HRP («Dako», США) согласно инструкции производителя. Экспрессию маркеров оценивали с помощью инвертированного микроскопа «Axiovert 200» («Carl Zeiss»).

Анализ секреции сосудистого эндотелиального фактора роста культурами МСК ЖТ. Образцы кондиционированной среды (супернатанты) от всех культур клеток собирали в пробирки и замораживали при температуре -20°C (-70°C для хранения более 3 мес) для последующего анализа содержания в них сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для анализа секреции сосудистого эндотелиального фактора роста культурами МСК ЖТ использовали набор для ИФА VEGF человека («R&D Systems») в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Оценка специфических маркеров фибробластов по внутриклеточной экспрессии мРНК в различных культурах клеток. Для проведения молекулярного анализа методом обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) были выбраны следующие маркерные гены — COL3A1 (коллаген III типа) и MMP1 (металлопротеиназа-1 либо коллагеназа фибробластов). Клеточная культура остеосаркомы человека — NOS — выбрана в качестве положительного контроля для оценки экспрессии мРНК

коллагена III типа и металлопротеиназы-1 в изучаемых образцах. Выделение РНК проводили с использованием коммерческого набора «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США). Спектрофотометрическое определение качества и количества РНК осуществляли на спектрометре «GeneQuant» (Швеция). При этом оценивали примесь белков по соотношению поглощения ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм (для нуклеиновых кислот) и 280 нм (для белков) и примесь углеводов по соотношению 260/230. Образец суммарной РНК считали чистым при значении показателей более 1,8.

Метод обратной транскрипции заключается в синтезе комплементарных цепочек ДНК (кДНК), в качестве матрицы используется выделенная РНК. Для этого к пробе, содержащей 100 нг—5 мкг выделенной РНК, добавляли 1 мкл 0,2 мкг/мкл случайных праймеров («Random Hexamer»). Объем образца доводили до 12,5 мкл дистиллированной водой, быстро перемешивали и инкубировали при 65°C в течение 5 мин для деградации вторичной структуры молекул нуклеиновой кислоты. К охлажденной пробе добавляли смесь компонентов:

5X reaction buffer for Reverse Transcription — 4 мкл;
RNase Inhibitor (40 МЕ/мкл) — 0,5 мкл;
dNTP Mix, 10 ммоль каждого — 2 мкл (1 ммоль конечная концентрация);

M-MuLV Reverse Transcriptase (20 МЕ/мкл) — 2 мкл.

Реакционную смесь перемешивали и инкубировали в амплификаторе в течении 10 мин при 25°C, 60 мин при 45°C и 10 мин при 70°C.

Для постановки ОТ-ПЦР использовали праймеры к коллагену III типа и металлопротеиназе I типа («Прайм-Тех», Беларусь) (табл. 1). Основу реакционной смеси составлял TaqMan Universal PCR Master Mix («Applied Biosystems», Россия), в состав которого входил фермент урацил-N-гликозилаза (UNG AmpErase), позволяющий предотвратить повторную реамплификацию продуктов при перекрестной контаминации продуктов ПЦР. К 2x TaqMan Master Mix добавляли смесь праймеров (40 ммоль) и пробы (200 ммоль), доводили объем H₂O до 20 мкл. Для постановки ОТ-ПЦР 5 мкл кДНК исследуемых образцов добавляли к 20 мкл реакционной смеси. Для нормализации возможных вариаций в количестве и качестве РНК в качестве референс-гена, экспрессируемого на постоянном уровне во всех экс-

периментальных образцах, применяли ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Амплификацию и уровень экспрессии гена определяли с использованием прибора и программного обеспечения iCycler («BioRad», США).

Для статистической обработки данных применяли прикладной программный пакет STATISTICA 6.0. Проверку статистических гипотез о виде распределения количественных признаков осуществляли на основании критерия Шапиро—Уилка. Результаты представлены в формате Me [25-й; 75-й перцентили]. Для сравнения динамики изменения показателя в исследуемых группах использовали критерий Вилкоксона для парных сравнений. При сравнении показателей в независимых группах применяли U-тест Манна—Уитни. Различия считали достоверными при P<0,05 [13].

Результаты и обсуждение

В ходе микроскопического анализа роста клеток уже в первые дни культивирования выявлены значительные изменения морфологии нестимулированных МСК и МСК, культивируемых в среде с ростовыми факторами (рис. 1), характер которых зависел от используемого протокола культивирования.

В конфлюэнтных культурах нестимулированных МСК из-за неравномерного роста клеток (типичного для пассируемых культур ранних пассажей) наблюдалось увеличение числа и размеров зон гиперконфлюэнтности, разделенных участками с низкой плотностью клеток. Пролиферативный потенциал был снижен за счет контактного торможения, но протекающие процессы деления клеток отмечались визуально на протяжении всего времени культивирования. В культурах преобладали крупные распластанные клетки фибробластно-подобной морфологии, с четким ядром и ядрышками, развитым цитоскелетом. В гиперконфлюэнтных участках из-за плотного контакта клеток их размер был значительно меньше, и они приобретали веретеновидную форму (см. рис. 1, а).

Клетки, культивируемые согласно протоколу, выбранному в качестве прототипа, формировали более равномерный слой со специфическим взаимно параллельным расположением веретеновидных клеток на поверхности культурального пластика. К концу 1-й недели культивирования происходило значительное изменение морфологии клеток: отмечалось утончение

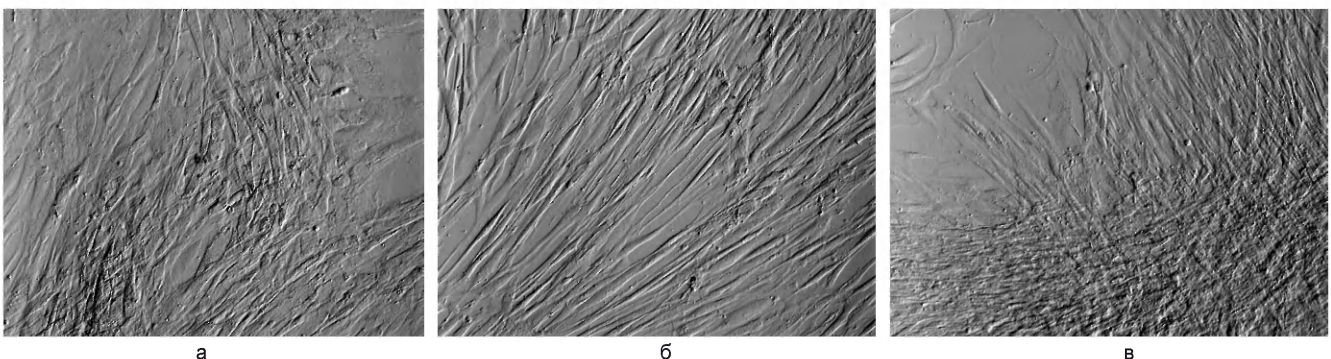


Рис. 1. Нестимулированные МСК ЖТ (а) и МСК, культивируемые в условиях направленной дифференцировки в фибробласты (б — протокол-прототип, в — разработанный протокол) на 7-е сутки культивирования. Ув. 100

и удлинение псевдоподий клеток, увеличение грануляции цитоплазмы (см. рис. 1, б). Низкий пролиферативный потенциал клеток и гибель их небольшого количества в бессывороточных условиях культивирования приводили к снижению плотности клеток в культуре. На заключительном этапе дифференцировки (10—14 сут культивирования) наблюдалось снижение степени адгезии клеток к пластику, что обуславливало спонтанное или механическое открепление небольших участков монослоя конфлюэнтной культуры. На 14-е сутки культивирования культуры нестимулированных МСК и клеток, подвергшихся направленной дифференцировке в фибробласты, были сняты с поверхности культурального пластика для фенотипического и молекулярно-генетического исследования экспрессии тканеспецифических маркеров.

В ходе культивирования, согласно разработанному способу дифференцировки, происходило значительное увеличение плотности культуры, при этом численность клеток продолжала нарастать, несмотря на отсутствие свободного пространства на поверхности культурального пластика (см. рис. 1, в). На 6—8-е сутки культивирования наблюдалась полная потеря адгезивных свойств клеток и открепление гиперконфлюэнтной культуры крупными конгломератами от пластика. По причине снижения жизнеспособности открепившихся клеток и образования ими крупных агрегатов время культивирования было уменьшено до 8 сут. Снятие культуры не требовало дополнительной ферментативной обработки.

По окончании экспериментов по направленной дифференцировке МСК в фибробласты проведено сравнение фенотипа нестимулированных МСК и клеток, культивируемых двумя различными способами в течение 8—14 сут в присутствии 2 коктейлей факторов роста — FGF β , EGF, TGF β 1 (прототип) и FGF β , EGF, TGF β 1, TGF β 3 и 0,9% человеческой сыворотки (предлагаемый способ), как показано в табл. 2.

После культивирования МСК ЖТ в условиях направленной *in vitro* дифференцировки в фибробласты согласно протоколу-прототипу наблюдалось снижение количества клеток CD90+ на 21,4%, разработанному способу — на 89,7% ($P < 0,01$), а также отмечалось снижение степени экспрессии основного маркера МСК CD90 по сравнению с недифференцированными МСК (рис. 2).

Следует отметить, что в культуре клеток, культивируемых в условиях направленной дифференцировки в фибробласты, наблюдалось также снижение интенсивности флюоресценции моноклональных антител CD105, CD44 и с CD119^{high} до CD119^{low}, что может характеризовать степень экспрессии характерных для МСК маркеров и, следовательно, изменение фенотипа и функции клеток. По уровню маркера CCR7 во всех культурах МСК ЖТ сохранялась стабильно высокая клеточная миграционная способность. В отношении остальных маркеров различий в уровнях экспрессии не наблюдалось.

На рис. 3 представлены результаты иммуноцитохимического исследования экспрессии нестимулированных МСК и МСК, культивируемых согласно заявленному способу направленной дифференцировки, специфических маркеров фибробластов (внутриклеточный маркер фибробластов и коллаген III типа). Установлена экспрессия данных маркеров как в контрольных культурах, так и в МСК ЖТ, культивируемых в присутствии ростовых факторов. При этом наблюдалось более интенсивное окрашивание клеток, культивируемых в дифференцировочных условиях, за счет высокой плотности клеточных культур.

Исследования секреции сосудистого эндотелиального фактора роста показали, что МСК ЖТ ранних пассажей обладают высокой секреторной активностью в отношении VEGF. Так, уровни продукции VEGF первичной культурой МСК ЖТ составили 2406 [1732; 3121] пг/мл в пересчете на 10⁵ клеток. При культиви-

Таблица 1

Характеристика праймеров

Исследуемый ген	Последовательность праймера (5'—3')	Последовательность пробы (5'—3')
COL3A1 (коллаген III типа)	F-CCCCTATTATTTTGGCACAACAG R-AACGGATCCTGAGTCACAGACA	ATGTTCCCATCTTGGTCAGTCCSTATGCG
MMP1 (металлопротеиназа I типа)	F-CGGTTTTTCAAAGGGAATAAGTACT R-TCAGAAAGAGCAGCATCGATATG	AATGTGCTACACGGATACCCCAAGGACA

Таблица 2

Экспрессия CD маркеров МСК в условиях направленной дифференцировки в фибробласты

Культура МСК ЖТ 2-го пассажа	Количество клеток, %									
	CD90	CD105	CD44	CD119	CCR7	CD45	CD31	CD34	HLA-ABC	HLA-DR
Нестимулированная	98,1 [96,9; 99,1]	97,1 [93,8; 98,2]	99,4 [99,0; 99,9]	91,5 [87,6; 96,7]	91,3 [87,0; 96,1]	0,5 [0,3; 0,9]	0,4 [0,3; 0,8]	0,1 [0,0; 0,3]	98 [95,0; 98,9]	0,09 [0,01; 0,2]
Протокол-прототип	76,7 [0,01; 0,2]	82,1 [0,01; 0,2]	90,3 [0,01; 0,2]	78,5 [0,01; 0,2]	85,2 [0,01; 0,2]	0,3 [0,1; 0,2]	0,7 [0,3; 1,1]	1,6 [1,1; 2,2]	96,1 [0,01; 0,2]	0,1 [0,03; 0,2]
Разработанный способ	8,4*** [0,01; 0,2]	85,5 [0,01; 0,2]	86,8 [0,01; 0,2]	86,2 [0,01; 0,2]	81,7 [0,01; 0,2]	1,7 [0,1; 0,2]	1,14 [0,9; 2,2]	0,4 [0,2; 0,9]	97,3 [0,01; 0,2]	0,8 [0,6; 1,9]

*Достоверность различий показателей по сравнению с нестимулированной культурой МСК ЖТ 2-го пассажа ($P < 0,01$).

**Достоверность различий показателей по сравнению с культурой МСК ЖТ 2-го пассажа, дифференцированной по протоколу-прототипу ($P < 0,01$).

ровании в условиях направленной дифференцировки в фибробласты секреция VEGF культурами МСК увеличивалась и составила 5151 [4613; 5987] пг/мл на 10^5 клеток ($P < 0,01$).

Учитывая, что VEGF является ключевым ангиогенным фактором, который активирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, увеличивает проницаемость кровеносных сосудов и стимулирует ангиогенез, можно предположить, что способность МСК к продукции данного фактора будет способствовать васкуляризации трансплантатов на основании МСК.

Для оценки уровня экспрессии мРНК генов коллагена III типа и MMP1 использовали нативные культуры МСК 2-го пассажа и первичной культуры, МСК 2-го пассажа, культивируемых в условиях направленной дифференцировки в фибробласты по разработанному способу.

Молекулярный анализ экспрессии мРНК был проведен с использованием метода ОТ-ПЦР, основанного на использовании флуоресцентных красителей, что позволяет с высокой чувствительностью регистрировать флуоресцентный сигнал, коррелирующий с количеством исследуемой мишени (ДНК или кДНК) в образце.

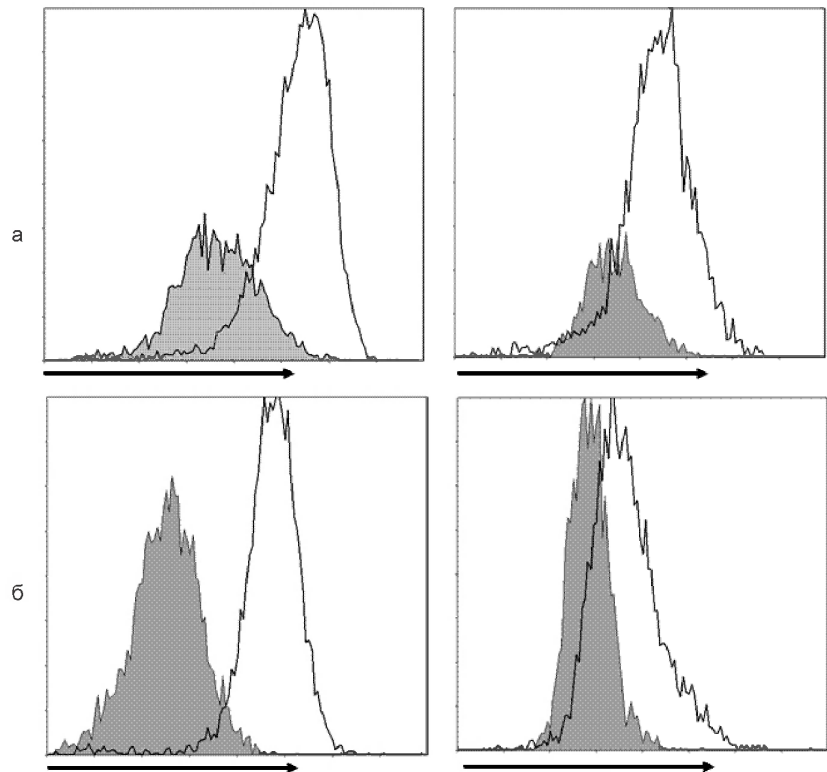
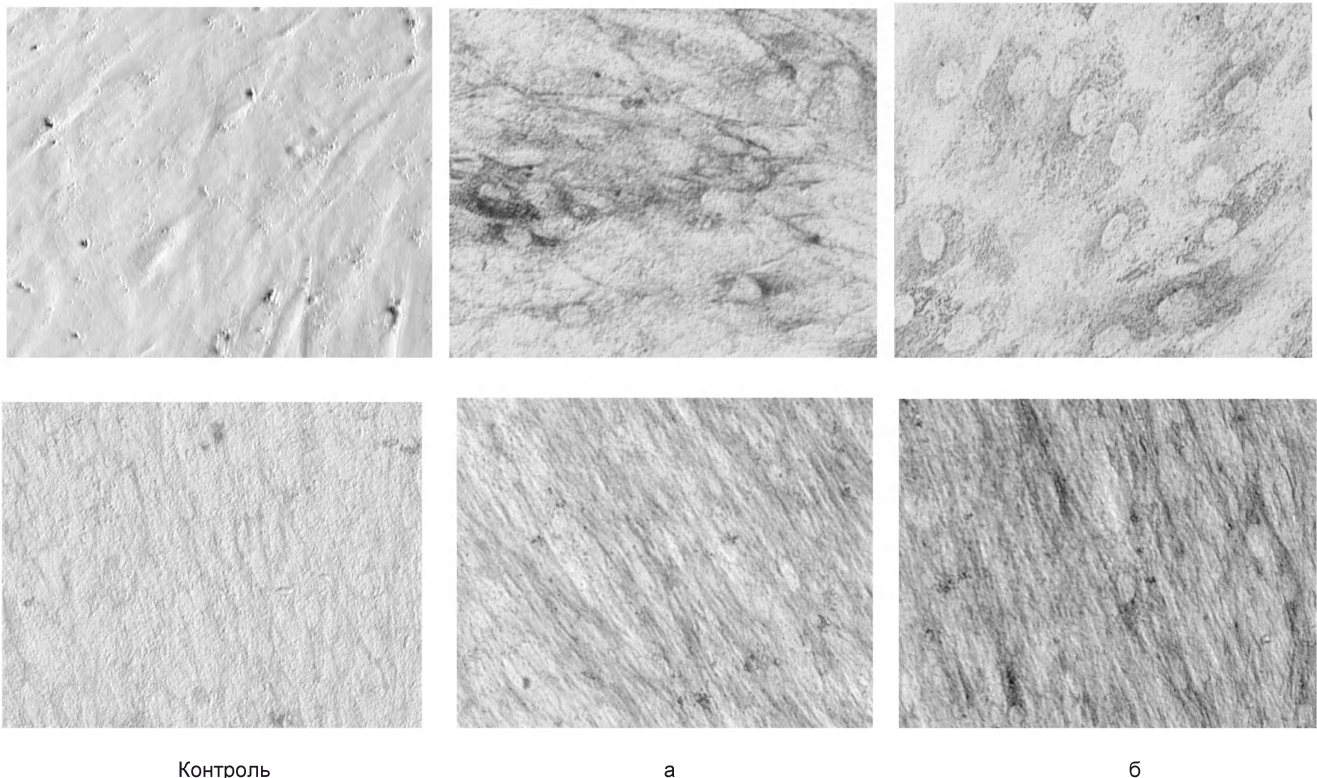


Рис. 2. Экспрессия маркеров стволовых клеток CD90 и CD105 нестимулированными МСК (светлые гистограммы) и МСК, культивируемыми в условиях направленной дифференцировки в фибробласты (серые гистограммы): а — по протоколу-прототипу; б — по разработанному способу



Контроль

а

б

Рис. 3. Экспрессия нестимулированными МСК (верхний ряд) и МСК, культивируемыми в условиях направленной дифференцировки в фибробласты (нижний ряд), внутриклеточного маркера фибробластов (а) и коллагена III типа (б). Ув. 100

Относительный уровень экспрессии мРНК коллагена III типа и MMP1 в нестимулированных МСК ЖТ и МСК ЖТ, культивируемых в условиях дифференцировки в фибробласты

Исследуемый ген	Первичная культура МСК ЖТ	МСК ЖТ 2-го пассажа	МСК ЖТ 2-го пассажа (разработанный способ дифференцировки)
COL3A1 (коллаген III типа)	139 [137,8; 150,1]	10,9 [8,5; 11,2]*	480,1 [478,4; 487,3] ***
MMP1 (металлопротеиназа I типа)	5,8 [5,0; 6,1]	1,2 [1,1; 2,1]*	40,3 [31,4; 44,8] ***

*Достоверность различий показателей по сравнению с первичной культурой МСК ЖТ (P<0,01)

**Достоверность различий показателей по сравнению с культурой МСК ЖТ 2-го пассажа (P<0,01).

Согласно данным, представленным в табл. 3, мРНК коллагена III типа и металлопротеиназы I типа экспрессируются в культуре МСК ЖТ 2-го пассажа на низком уровне (P<0,01) и составляют 10,9 [8,5; 11,2] и 1,2 [1,1; 2,1] соответственно, тогда как на уровне первичной культуры уровень экспрессии значительно выше — 139 [137,8; 150,1] и 5,8 [5,0; 6,1] соответственно, что, по-видимому, обусловлено гетерогенностью первичных культур МСК и возможной примесью фибробластов.

Определение экспрессии данных генов в МСК, культивируемые в предложенной дифференцировочной среде, показало увеличение уровня экспрессии мРНК коллагена III типа в 44 и 3,5 раза (P<0,01) по сравнению со 2-м пассажем и первичной культурой МСК соответственно. Сходные данные получены и при оценке уровня экспрессии мРНК MMP1 в коммитированных в направлении фибробластов МСК. Относительный уровень экспрессии MMP1 в данном случае увеличился в 33,6 раза по сравнению со 2-м пассажем МСК и в 7 раз — по сравнению с первичной культурой (P<0,01).

Повышение относительного уровня экспрессии мРНК коллагена III типа до 480,1 [478,4; 487,3] и MMP1 — до 40,3 [31,4; 44,8] при культивировании МСК 2-го пассажа в среде с FGFβ, EGF, TGFβ1, TGFβ3 и 0,9% человеческой сыворотки свидетельствует о коммитировании МСК, культивируемых в данных условиях, в направлении фибробластов.

При этом относительно первичной культуры МСК ЖТ динамика нарастания экспрессии MMP1 по сравнению с коллагеном III типа на молекулярном уровне свидетельствует о большей способности культивируемых в дифференцировочной среде МСК ЖТ к ремоделированию соединительной ткани, чем к ее структуризации.

Выводы

1. Разработанный способ направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека позволяет сократить время культивирования до 6—7 сут, получить равномерный активный рост клеточной культуры с высоким пролиферативным потенциалом.

2. Результаты исследования экспрессии поверхностных маркеров указывают на достоверное изменение фенотипа полученной в процессе дифференцировки клеточной культуры фибробластов за счет значительного снижения (на 89,7%) основного маркера мезенхимальных стволовых клеток жировой тка-

ни CD90. Снижение интенсивности флюоресценции моноклональных антител CD105, CD44 и с CD119^{high} до CD119^{low} также может характеризовать степень экспрессии характерных для мезенхимальных стволовых клеток маркеров и, следовательно, изменение фенотипа и функции клеток. Во всех культурах установлено сохранение высокой клеточной миграционной способности мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани по уровню маркера CCR7.

3. Выявлено, что способностью экспрессировать специфические маркеры фибробластов (внутриклеточный маркер фибробластов и коллаген III типа) обладает как первичная культура мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, так и культуры клеток, коммитированные в направлении фибробластов. Более интенсивное окрашивание клеток, культивируемых в дифференцировочных условиях, происходит за счет более высокой плотности клеточных культур.

4. Васкуляризация трансплантатов — одно из необходимых условий их приживления, поэтому выявленная высокая способность культур мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани к продукции VEGF подтверждает перспективность их использования в качестве источника клеточного материала для трансплантации при пластических операциях на передней брюшной стенке.

5. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в присутствии коктейля факторов роста (FGFβ, EGF, TGFβ1, TGFβ3 и 0,9% человеческой сыворотки) приводит к изменению функциональных свойств клеток в виде достоверного (P<0,01) роста уровня экспрессии мРНК коллагена III и металлопротеиназы I типа, что может позитивно влиять как на структуризацию, так и на ремоделирование соединительной ткани. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, подвергнутые направленной дифференцировке, могут быть использованы в составе биологического трансплантата в качестве клеточных активаторов для улучшения метаболизма и структуры синтезируемой *in vivo* соединительной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клишов А. А. Гистогенез и регенерация тканей.— Л., 1984.
2. Бозо И. Я., Деев Р. В., Пинаев Г. П. // Цитология.— 2010.— Т. 52, № 2.— С. 99—109.
3. Быков В. Л. Цитология и общая гистология.— М., 2002.— С. 286—291.
4. Зорин В. Л., Зорина А. И., Черкасов В. Р. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.— 2009.— Т. IV, № 3.— С. 68—70.

5. Новицкий В. В., Шахова В. П., Хлусова И. А., Дамбаева Г. Ц. Введение в методы культуры клеток, биоинженерия органов и тканей.— Томск, 2004.
6. Зорина А. И., Бозо И. Я., Зорин В. Л. и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.— 2011.— Т. VI, № 2.— С. 15—26.
7. Mizuno H. // J. Nippon. Med. Sch.— 2009.— Vol. 76, № 2.— P. 56—66.
8. Кирик В. М., Бутенко Г. М. // Журн. АМН України.— 2010.— Т. 16, № 4.— С. 576—604.
9. Zhou D. H., Huang S. L., Wu Y. F., et al. // Zhonghua Er. Ke Za Zhi.— 2003.— Vol. 41, № 8.— P. 607—610.
10. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., et al. // Tissue Engineering.— 2001.— Vol. 7, № 2.— P. 211—228.
11. Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J. // Stem Cells.— 2007.— Vol. 25, № 11.— P. 2739—2749.
12. <http://www.wipo.int/patentscope/WO2009155334>.
13. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA.— М., 2002.

Поступила 16.09.11.

CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL STEM CELLS OF HUMAN FAT DIFFERENTIATED IN FIBROBLASTIC DIRECTION

V. G. Bogdan, M. M. Zafranskaya, S. S. Bagatka, M. Yu. Yurkevich, Yu. M. Gain, Yu. E. Demidchik

Objective. To develop a technique for differentiating the mesenchymal stem cells of human fat (MSC HF) in the fibroblastic direction changing the cell functional state and assessing their application within the biological transplant.

Materials and methods. The MSC HF samples taken in five patients with post-operative ventral hernias of a large size were studied. Cultural methods, flow cytometry, microscopy, immune-cytochemical and immune-enzyme assays, reverse transcriptase polymerase chain reaction, quantitative polymerase chain reaction in real time, statistical analysis were applied.

Results. The MSC HF samples culturing in presence of the growth factors (FGF β , EGF, TGF β 1, TGF β 3, and 0.9% human serum) cocktail was determined to lead to the cell functional characteristics changing declared by a reliable growth of the collagen III mRNA and matrix metal proteinase 1 expression and a higher ability to produce the growth factor of vascular endothelium. The method developed allows reduce the culturing duration and provide an even active growth of the cell culture. The most intensive staining in response to the specific markers (intracellular marker of fibroblasts and collagen III) of fibroblasts in the cells cultured under the differentiation conditions was found to occur due the cellular culture higher density. The phenotype of the cellular culture obtained during the differentiation process was determined to be changed because of a significant reduction (by 89.7%) of the MSC HF main marker CD90, of the monoclonal antibodies CD105, CD44 fluorescence intensity reduction as well as of the CD119^{high} lowering to CD119^{low}, the MSC HF high cellular migration capacity by the CCR7 level remaining intact.

Conclusion. Differentiation in the fibroblastic direction applying the technique developed leads to the MSC HF functional state changing allowing their application as cellular activators in the biological transplants for improving metabolism and the structure of the connective tissue synthesized in vivo.

Key words: mesenchymal stem cells of human fat, differentiation, collagen, matrix metal proteinase.

Адрес для корреспонденции:

Богдан Василий Генрихович.

Белорусский государственный медицинский университет.

220036, г. Минск, ул. Р. Люксембург, 110; сп. тел. (8-017) 208-68-87.

В. А. КРАСНОБАЕВ, А. К. УСОВИЧ, И. А. ПЕТЬКО

ВОЗРАСТНЫЕ ЖЕЛЕЗИСТО-СТРОМАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЕ

Витебский государственный медицинский университет

Цель исследования. Выявить изменения в железисто-стромальных отношениях в простате человека, происходящие в процессе возрастной инволюции органа.

Материал и методы. Проведено исследование 80 препаратов простат мужчин 36—83 лет.

Результаты. Для простаты мужчин в возрасте 36—60 лет характерно статистически достоверное увеличение удельного объема железистого эпителия и уменьшение удельного объема мышечной ткани. В возрасте 61—74 лет удельный объем железистой паренхимы в целом достоверно уменьшается. В старческом возрасте (75 лет и старше) в среднем для органа в сравнении с возрастом 61—74 лет вдвое уменьшаются удельные объемы мышечной ткани и эластических волокон. У некоторых мужчин 50 лет структура железистой паренхимы и мышечно-соединительнотканной стромы простаты не отличается от таковой у 30-летних, и наоборот, у молодых мужчин гистологическая картина соответствует состоянию органа в пожилом возрасте.

Заключение. На протяжении 36—60 лет наиболее ярко проявляются индивидуальные особенности строения простаты. Общая тенденция структурных изменений в простате мужчин пожилого возраста — это атрофия желез

и склеротические процессы в соединительнотканно-мышечной строме. В старческом возрасте процессы атрофии желез и склероза в строме в сравнении с предыдущим возрастным периодом еще более выражены. Характер инволюционных изменений гистоструктуры простаты позволяет предположить, что инволюция органа идет от околососудистых зон. Процессы возрастной инволюции протекают вне строгой фиксированности к возрасту мужчины и носят сугубо индивидуальный характер.

Ключевые слова: простата, железисто-стромальные отношения, инволюция.

Доброкачественная гиперплазия простаты (ДГП) остается одним из наиболее распространенных заболеваний среди мужчин пожилого возраста [6]. Для установления четкой картины этиопатогенеза ДГП необходимо изучение развития и строения данного органа в разные возрастные периоды [9]. Процессы инволюции сопровождаются значительными изменениями в структуре органа. С возрастом происходит снижение уровня кровоснабжения простаты [7], что приводит к изменению структуры соединительной и мышечной ткани [4, 5, 8]. Результатом этого процесса является снижение сократительной и эвакуаторной способности органа, стаз секрета, что, по мнению некоторых исследователей, приводит к возникновению конкрементов [1—3].

Целью исследования явилось выявление изменений в железисто-стромальных отношениях в проста-