

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

©Коллектив авторов

СРАВНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ НА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ КУЛЬТУР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЭНДОМЕТРИЯ И ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА

А.Ю. Лупатов^{1*}, Р.Ю. Сарыглар¹, В.Д. Чупрынин², С.В. Павлович², К.Н. Ярыгин¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул. 10; эл. почта: alupatov@inbox.ru.

²Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, ул. Академика Опарина, 4, Москва

Мезенхимные стромальные клетки эндометрия (эМСК) наряду с мезенхимными стромальными клетками (МСК), изолированными из других тканей, являются перспективным клеточным материалом для использования в регенеративной медицине. К преимуществам эМСК относится их присутствие во взрослом организме, простота получения, высокий пролиферативный и дифференцировочный потенциалы. В данной работе методом проточной цитометрии мы оценили экспрессию 28 поверхностных молекулярных маркеров на 2-х культурах эМСК. Для сравнения использовали культуру МСК, изолированную из Вартонова студня пупочного канатика (пМСК), поскольку этот тип МСК был подробно изучен ранее и показал свою эффективность в исследованиях *in vivo*. Оба типа культур имели сходный профиль экспрессии поверхностных молекул, характерных для стволовых клеток, молекул клеточной адгезии и их лигандов, рецепторных молекул, ответственных за клеточный метаболизм и пролиферацию, а также молекул, опосредующих иммунологические реакции.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, мезенхимные стволовые клетки, эндометрий, пуповина, молекулярные маркеры

DOI 10.18097/PBMC20176301085

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) обладают мультипотентностью и способны дифференцироваться в направлении различных типов клеток мезенхимного происхождения, за исключением клеток гемопоэтического ряда. Функционально активные МСК присутствуют как в эмбриональных тканях (включая внезародышевые ткани эмбриона) так и в тканях взрослого организма. *In vivo* для МСК характерны невысокая пролиферативная активность и способность поддерживать свою популяцию, в том числе за счёт асимметричного деления, при котором одна из дочерних клеток сохраняет мультипотентные свойства, а вторая вступает на путь дифференцировки. Вовлечённость МСК в физиологическую и репаративную регенерацию обусловлена их способностью мигрировать в поврежденную ткань и стимулировать процесс её восстановления путём замены клеток и высвобождения паракринных факторов [1]. Это свойство, наряду с относительной легкостью поддержания в культуре, делает МСК весьма перспективными для использования в регенеративной медицине в качестве клеточного препарата.

МСК обладают низкой иммуногенностью, что позволяет создавать препараты не только на основе собственных клеток пациента, но и аллогенных клеток. Для этой цели наиболее перспективным источником МСК являются внезародышевые ткани, обычно подлежащие утилизации после родов. Клетки, изолированные из пуповины или детской

части плаценты, обладают высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом и легко поддерживаются в культуре. МСК из Вартонова студня пупочного канатика (пМСК) могут быть использованы в клинике как для стимуляции регенерации [2, 3], так и для лечения аутоиммунных заболеваний [4], что обусловлено их способностью подавлять иммунологические реакции. Однако в случае аллогенных клеточных препаратов только временный паракринный эффект может оказывать терапевтическое воздействие, поскольку, несмотря на низкую иммуногенность, время существования таких клеток в организме ограничено. В связи с этим, в целом ряде случаев аутоотрансплантация МСК может оказаться более эффективной. Для получения аутологичных МСК обычно используют биоптаты костного мозга или жировой ткани. В обоих случаях процедура биопсии может плохо переноситься пациентами и вызывать серьезные осложнения. Кроме того, полученные таким способом клеточные культуры обычно обладают невысоким пролиферативным потенциалом. Альтернативой, по крайней мере, в случае пациентов-женщин, могут служить МСК, изолированные из эндометрия (эМСК).

Способность к эффективной физиологической регенерации является отличительной особенностью эндометрия. У женщин за репродуктивный период эндометрий подвергается более чем 400 циклам регенерации [5]. Не удивительно, что эМСК в культуре обладают высоким пролиферативным потенциалом и скоростью пролиферации. При этом подобно другим МСК, они способны дифференцироваться

* - адресат для переписки

в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях [6]. В отличие от МСК костного мозга и жировой ткани получение биологического материала для выделения эМСК обычно не вызывает проблем. Он может быть получен в результате биопсии эндометрия, включая пайпель биопсию (вакуумную аспирацию), и даже из менструальной крови [7].

В данной работе мы сравнили экспрессию ряда поверхностных молекул, на культурах МСК, изолированных из Вартонова студня пупочного канатика и эндометрия человека, чтобы показать их сходства и возможные различия. Особое внимание уделялось экспрессии молекул, способных выступать в качестве молекулярных маркеров клеточной популяции или влиять на терапевтические свойства клеток при трансплантации.

МЕТОДИКА

Культуры эМСК были получены из биопсийного материала нормального эндометрия пациенток, проходящих лечение в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова по поводу экстрагенитального эндометриоза и давших информированное согласие на участие в исследовании, включая использование биопроб. Ткань механически измельчали и инкубировали в фосфатно-солевом буфере ("ПанЭко", Россия), содержащем 2-х кратный раствор антибиотика-антимикотика ("Gibco", США), по 50 ед./мл коллагеназы I-го и IV-го типов ("Sigma", США) при температуре 37°C в течение двух часов при постоянном перемешивании. После ферментативной обработки клеточную суспензию фильтровали через фильтр с диаметром пор 70 мкм.

Культура МСК из Вартонова студня пупочного канатика была получена ранее [8]. Клетки пуповины и эндометрия культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM/F-12 GlutaMAX™ ("Gibco") с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("Gibco"), антибиотика и антимикотика, в культуральных флаконах 75 мл ("Greiner", Германия). Фотосъемку культур проводили с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 40 CFL ("Carl Zeiss", Германия) и цифровой фотокамеры Nikon D5000.

Для проведения цитометрического анализа клетки переводили в суспензию с помощью раствора

Версена и трипсина ("ПанЭко"), плотность клеток подсчитывали в камере Горяева. Клетки отмывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин и 0,01% азид натрия для инкубации с антителами. Для окрашивания использовали моноклональные антитела к поверхностным маркерам, конъюгированные с флуорохромами ("BD Bioscience", США), в качестве отрицательного контроля применяли изотипические антитела, конъюгированные с соответствующим флуорохромом. Инкубацию с антителами проводили в суспензии, содержащей 2×10⁵ клеток в 50 мкл, при 4°C в течение часа в защищенном от света месте. Клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером и фиксировали раствором Cytofix™ ("BD Bioscience"). Анализ проводили на цитофлуориметре-сортере FACS Aria ("BD Bioscience"). Для обработки полученных результатов использовали программу FlowJo 7.6.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед проведением экспериментов по оценке уровня экспрессии поверхностных молекул две культуры эМСК и одну культуру пМСК поддерживали на протяжении 7-10 пассажей после первого субкультивирования. Все клетки имели фибробластоподобную морфологию, хотя и с некоторыми особенностями (рис. 1). Для культуры пМСК при достижении конфлюентного монослоя была характерна биполярная нитевидная форма (рис. 1А), тогда как эМСК обладали скорее веретеновидной морфологией (рис. 1Б) со значительным присутствием полигональных клеток в культуре эМСК-2 (рис. 1В). Удвоение клеточной популяции при пассировании происходило за 4-5 дней, что свидетельствует о высокой скорости пролиферации, характерной для этих культур. Особенностью клеток, изолированных из эндометрия, была способность к длительному существованию в условиях контактного торможения. Обе культуры эМСК при условии периодической смены среды для культивирования могли находиться в состоянии конфлюентного монослоя более 2 недель без видимых морфологических изменений. Напротив, подавляющее большинство клеток пуповины уже через 2 дня после достижения плотного монослоя откреплялись от подложки и погибали.

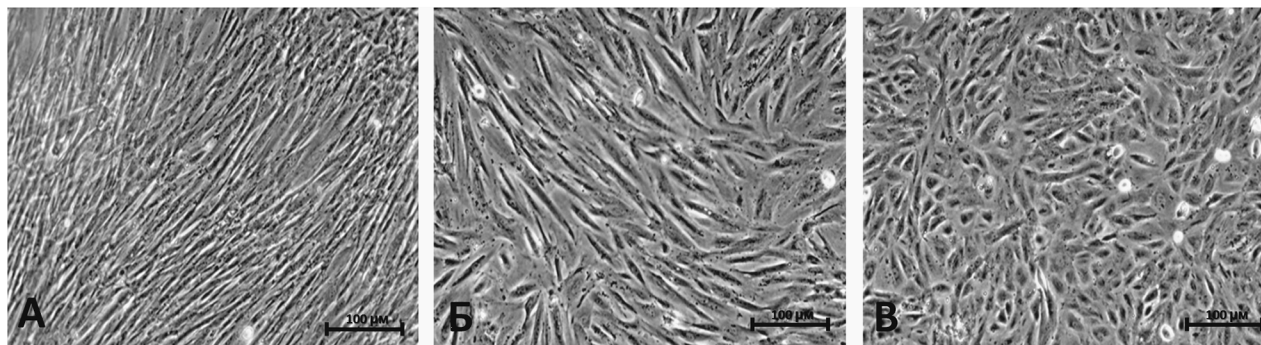


Рисунок 1. Особенности морфологии исследуемых культур МСК. А - пМСК; Б - эМСК-1; В - эМСК-2. Световая микроскопия, фазовое контрастирование.

Согласно рекомендациям Международного общества клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy (ISCT)), признаками принадлежности клеток к популяции МСК являются: адгезионный рост в культуре; способность к индуцированной дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях; экспрессия поверхностных маркеров CD73, CD90, CD105; отсутствие экспрессии маркеров гемопоэза [9]. Мы оценили экспрессию соответствующих поверхностных маркеров на культурах эМСК. Поскольку принадлежность фибробластоподобных клеток, изолированных из пупочного канатика к популяции МСК хорошо установлена [10, 11] мы использовали культуру пМСК для сравнения. Уровень экспрессии CD73, CD90 и CD105 на обеих культурах эМСК

был сходным с уровнем экспрессии тех же маркеров на пМСК (рис. 2, таблица). Кроме того, эМСК не экспрессировали гемопоэтические маркеры (CD45, CD34, CD11b, CD19), а также молекулы клеточной адгезии, характерные для эпителиальных клеток: CD24, CD66, CD227 (MUC1), CD326 (EpCAM) (таблица). Таким образом, если учесть, что эМСК представляют собой адгезионную культуру, способную к разнонаправленным дифференцировкам [6], то по своим свойствам и фенотипу они могут быть отнесены к МСК.

Рецептор гиалуроновой кислоты CD44 часто используют в качестве дополнительного маркера МСК. Экспрессия этого маркера на эМСК была существенно выше, чем на пМСК (рис. 2, таблица). Ранее мы показали, что пМСК имеют более низкий уровень

Таблица. Экспрессия поверхностных маркеров на исследуемых культурах МСК. Цифры в столбцах - интенсивность флуоресценции, выраженная в условных единицах. В скобках - коэффициент вариации. Жирным шрифтом выделены маркеры, присутствующие на клетках

	CD и HLA молекулы	Основное название	Изотипический контроль	МСК пуповины	МСК-1 эндометрия	МСК-2 эндометрия
Маркеры МСК	CD73	Ecto-5'-nucleotidase	2 (86)	385 (114)	704 (105)	620 (93)
	CD90	Thy-1	3 (74)	58 (106)	92 (88)	78 (79)
	CD105	Endoglin	2 (84)	62 (62)	45 (90)	46 (82)
Маркеры гемопоэза	CD19	B4	2 (177)	4 (108)	5 (85)	4 (55)
	CD11b	Integrin α M	4 (134)	7 (56)	7 (84)	6 (97)
	CD34	HPCA1	3 (131)	4 (89)	4 (88)	5 (92)
	CD45	LCA	3 (146)	4 (130)	4 (126)	4 (112)
Молекулы клеточной адгезии и их лиганды	CD24	BBA-1	3 (124)	3 (142)	3 (313)	3 (280)
	CD44	H-CAM	2 (78)	407 (65)	1747 (65)	1570 (84)
	CD49b	Integrin α 2	4 (125)	108 (75)	115 (84)	111 (106)
	CD54	ICAM1	2 (97)	28 (218)	41 (172)	49 (183)
	CD66	CEACAM	2 (126)	2 (64)	2 (136)	4 (82)
	CD103	Integrin α E	3 (78)	4 (81)	3 (91)	4 (98)
	CD106	VCAM-1	2 (87)	2 (58)	1 (42)	3 (100)
	CD227	Muc1	2 (94)	2 (105)	4 (198)	5 (355)
Другие маркеры	CD326	EpCAM	3 (108)	2 (240)	3 (73)	3 (120)
	CD13	Aminopeptidase N	3 (72)	141 (95)	42 (156)	58 (140)
	CD91	LRP1	3 (78)	15 (90)	9 (75)	10 (87)
	CD117	SCFR	2 (95)	5 (73)	5 (92)	6 (84)
Молекулы иммунного ответа	CD163	M130	2 (117)	5 (124)	4 (184)	5 (110)
	HLA-ABC	-	2 (93)	11 (81)	12 (211)	10 (147)
	HLA-DR	-	2 (86)	2 (126)	3 (98)	1 (87)
	HLA-G	-	3 (71)	5 (87)	2 (127)	3 (111)
	HLA-E	-	3 (71)	6 (67)	3 (123)	5 (69)
	CD80	B7-1	3 (78)	2 (76)	2 (125)	3 (88)
	CD83	HB15	3 (78)	2 (84)	3 (109)	3(71)
	CD86	B7-2	3 (78)	2 (99)	2 (105)	3 (93)
	CD95	Fas	3 (72)	21 (82)	32 (125)	15 (112)

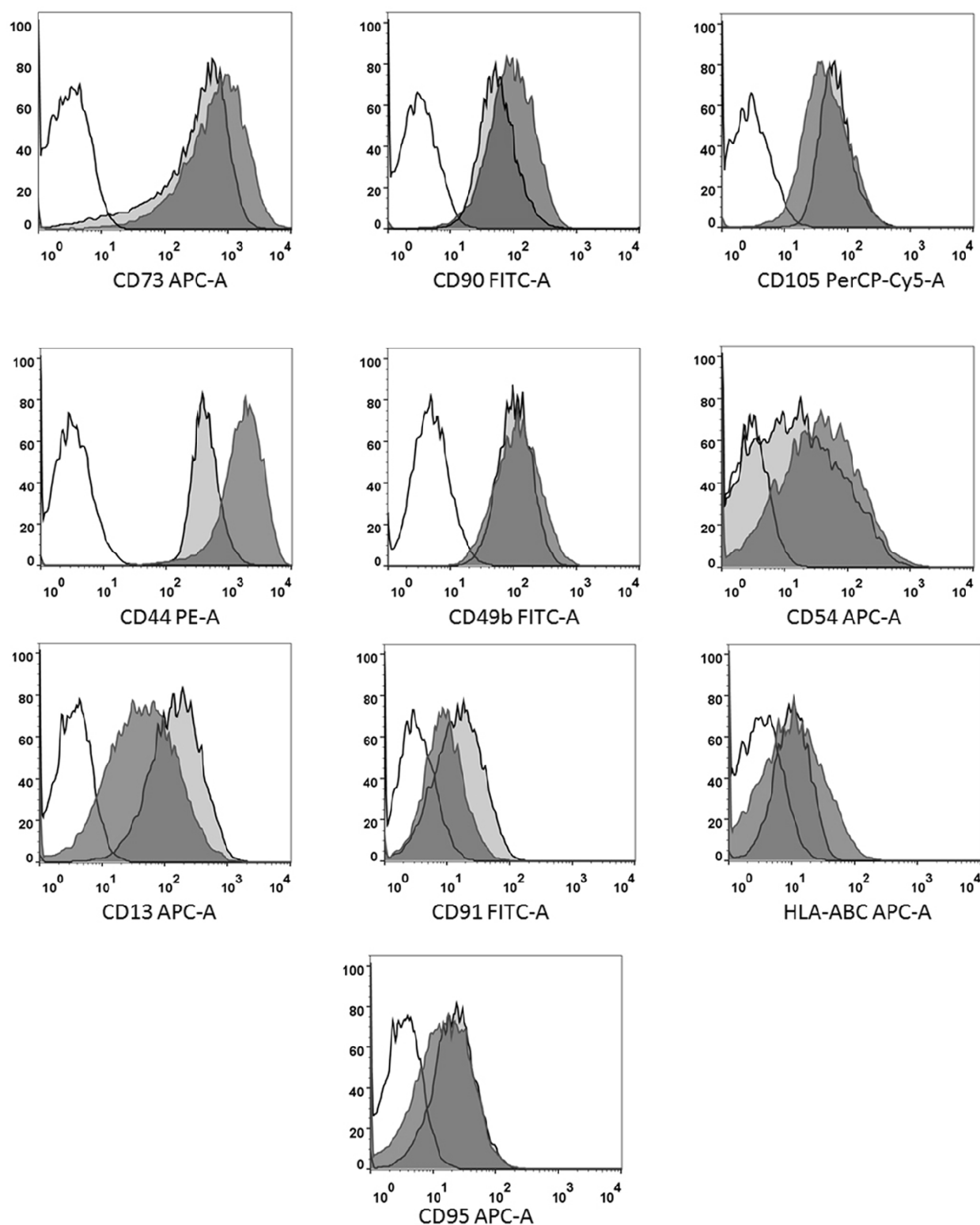


Рисунок 2. Цитофлуорограммы, демонстрирующие уровни экспрессии молекулярных маркеров на поверхности МСК. Неокрашенная гистограмма - изотипический контроль; светлая гистограмма - пМСК; тёмная гистограмма - эМСК-1. По оси абсцисс - интенсивность флуоресценции, по оси ординат - нормализованное к моде количество событий (клеток).

экспрессии CD44 по сравнению с фибробластами кожи [8]. Возможно, такое различие связано с особенностями внеклеточного матрикса, с которым взаимодействуют эМСК и фибробласты. Уровень экспрессии CD49b, который относится к β_1 -интегринам и выступает в качестве рецептора, связывающего

коллагены I и III типов, был одинаков у всех трёх исследованных культур клеток (рис. 2, таблица). Ещё одна молекула, ассоциированная с клеточной адгезией, – внутриклеточная молекула адгезии ICAM-1 (CD54) – является лигандом для β_2 -интегринов и играет важную роль при взаимодействии

с клетками иммунной системы. По нашим данным, она присутствовала на различных типах МСК, но не выявлялась на фибробластах кожи [8, 11]. Культуры эМСК также экспрессировали CD54, при этом уровень экспрессии был несколько выше, чем у пМСК (рис. 2, таблица). Экспрессия таких молекул клеточной адгезии как интегрин αE (CD103) и VCAM-1 (CD106) не была обнаружена на МСК.

Экспрессия мембранного гликопротеина CD13 (аминопептидаза N) характерна для стволовых и злокачественных клеток и связана с такими их свойствами как инвазивность, дифференцировка и апоптоз [12]. Хотя все три культуры МСК экспрессировали CD13, уровень его экспрессии на пМСК был выше. Несколько выше на пМСК был и уровень экспрессии CD91, рецепторной молекулы, которая участвует в эндоцитозе и, по-видимому, может предотвращать апоптоз фибробластов [13]. Экспрессия рецептора фактора стволовых клеток (CD117) и скавенджер рецептора (CD163) на исследуемых МСК отсутствовала (рис. 2, таблица).

При использовании МСК в терапевтических целях очень важно предвидеть, какая реакция со стороны иммунной системы последует на их введение. Особое значение это приобретает в случае аллотрансплантации клеток. Мы оценили уровень экспрессии ряда иммунорегуляторных молекул на поверхности эМСК и пМСК. Все культуры имели довольно низкий уровень экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса I – HLA-ABC (рис. 2) и вовсе не экспрессировали молекулы ГКГ класса II – HLA-DR. Неклассические молекулы ГКГ класса I – HLA-G, способные подавлять активность цитотоксических лимфоцитов и обычно экспрессирующиеся на цитотрофобласте плаценты [14], фактически отсутствовали на МСК пуповины и эндометрия. Не выявлялась и другая неклассическая молекула ГКГ класса I – HLA-E, регулирующая цитотоксичность естественных киллерных клеток (NK-клеток). Кроме того, на клетках отсутствовала экспрессия ко-стимулирующих молекул CD80, CD83, CD86 (таблица), которые участвуют в активации цитотоксических Т-лимфоцитов. Низкий уровень экспрессии HLA-ABC, отсутствие экспрессии ГКГ класса II и ко-стимулирующих молекул свидетельствуют в пользу того, что эМСК не будут активно элиминироваться эффекторами адаптивного иммунитета даже при аллогенной трансплантации. В то же время, слабая экспрессия HLA-ABC и отсутствие HLA-G молекул в определённой степени могут послужить причиной, направленной против эМСК цитотоксической активности со стороны NK-клеток, в том числе и при аутологичном введении МСК. О чувствительности исследуемых клеток к индуцируемому цитотоксическими лимфоцитами апоптозу свидетельствует наличие на мембране МСК Fas рецептора (CD95), хотя уровень его экспрессии невысок (рис. 2, таблица).

В совокупности проведённое исследование показывает, что эМСК имеют сходный профиль

экспрессии иммунорегуляторных молекул со слабоиммуногенными пМСК. По этой причине можно предположить, что при трансплантации эМСК не будут вызывать заметных иммунологических реакций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате проделанной работы было продемонстрировано сходство профилей экспрессии поверхностных маркерных молекул на МСК, изолированных из Вартонова студня пупочного канатика и эндометрия. В связи с этим можно сделать вывод о перспективности дальнейших работ по изучению возможности использования эМСК в качестве препарата для клеточной терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана РНФ, грант № 14-25-00179.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ярыгин К.Н. (2008) Патол. физиол. Экспер. тер., №1, 2-8.
2. Can A., Ulus A.T., Cinar O., Topal Celikkan F., Simsek E., Akyol M., Canpolat U., Erturk M., Kara F., Ilhan O. (2015) Stem Cell Rev., **11**, 752-760.
3. Zhang Z., Lin H., Shi M., Xu R., Fu J., Lv J., Chen L., Lu S., Li Y., Yu S., Geng H., Jin L., Lau G.K., Wang F.S. (2012) J. Gastroenterol. Hepatol., **27**(Suppl. 2), 112-120.
4. Li J.F., Zhang D.J., Geng T., Chen L., Huang H., Yin H.L., Zhang Y.Z., Lou J.Y., Cao B., Wang Y.L. (2014) Cell Transplant., **23**(Suppl. 1), 113-122.
5. Jabbour H.N., Kelly R.W., Fraser H.M., Critchley H.O. (2006) Endocr. Rev., **27**, 17-46.
6. Савилова А.М., Юшина М.Н., Рудимова Ю.В., Хилькевич Е.Г., Чупрынин В.Д. (2015) Клеточн. технол. биол. мед., №4, 252-257.
7. Rossignoli F., Caselli A., Grisendi G., Piccinno S., Burns J.S., Murgia A., Veronesi E., Loschi P., Masini C., Conte P., Paolucci P., Horwitz E.M., Dominici M. (2013) Biomed. Res. Int., 901821. DOI: 10.1155/2013/901821
8. Лунатов А.Ю., Вдовин А.С., Вахрушев И.В., Полтавцева Р.А., Ярыгин К.Н. (2014) Клеточн. технол. биол. мед., №4, 220-227.
9. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. (2006) Cytotherapy, **8**(4), 315-317.
10. Moretti P., Hatlapatka T., Marten D., Lavrentieva A., Majore I., Hass R., Kasper C. (2010) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., **123**, 29-54.
11. Лунатов А.Ю., Каралкин П.А., Суздальцева Ю.Г., Бурунова В.В., Ярыгин В.К., Ярыгин К.К. (2006) Клеточн. технол. биол. мед., №4, 212-217.
12. Wickström M., Larsson R., Nygren P., Gullbo J. (2011) Cancer Sci., **102**(3), 501-508.
13. Hu K., Lin L., Tan X., Yang J., Bu G., Mars W.M., Liu Y. (2008) J. Am. Soc. Nephrol., **19**(3), 503-514.
14. Carosella E.D., Moreau P., Le Maoult J., Le Discorde M., Dausset J., Rouas-Freiss N. (2003) Adv. Immunol., **81**, 199-252.

Поступила: 26. 10. 2016.
Принята к печати: 31. 01. 2017.

COMPARISON OF THE EXPRESSION PROFILE OF SURFACE MOLECULAR MARKERS
ON MESENCHYMAL STROMAL CELL CULTURES ISOLATED FROM
HUMAN ENDOMETRIUM AND UMBILICAL CORD

A.Yu. Lupatov¹, R.Yu. Saryglar¹, V.D. Chuprynin², S.V. Pavlovich², K.N. Yarygin¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia

²Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997 Russia

Endometrial mesenchymal stromal cells (eMSCs), along with mesenchymal stromal cells (MSCs) isolated from other tissues, are promising for use in regenerative medicine. The benefits of eMSCs include their presence in adults, simplicity of isolation, high proliferative and differentiation capacity. In this study, we have employed the flow cytometry technique to assess expression of 28 molecular markers on the surface of two eMSCs cultures. The culture of MSCs isolated from Wharton's jelly of the umbilical cord (uMSCs) was used as a reference, because uMSCs were studied in details earlier and demonstrated their effectiveness in vivo. Both types of MSCs demonstrated similar expression profiles. They included stem cells surface molecules, cell adhesion molecules and their ligands, some receptor molecules responsible for cell metabolism and proliferation, as well as immunological response molecules.

Key words: mesenchymal stromal cells, mesenchymal stem cells, endometrium, molecular markers, umbilical cord