

лимеров и после проведения которого полностью сохраняется бактерицидная активность образцов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Infections associated with medical devices / C. Von Eiff [et al.] // *Drugs*. — 2005. — Vol. 65. — P. 179–214.
2. *Watnick, P.* Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // *J Bacteriology*. — 2000. — Vol. 182. — P. 2675–2679.
3. *Costerton, J. W.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg // *Science*. — 1999. — Vol. 284. — P. 1318–1322.
4. *Тец, В. В.* Бактериальные сообщества. В кн.: Клеточные сообщества / В. В. Тец; под ред. В. Теца. — СПб.: Изд-во СПбГМУ, 1998. — С. 15–73.
5. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections / W. Costerton [et al.] // *Clinical Investigation*. — 2003. — Vol. 112. — P. 1466–1477.
6. *O'Toole, G. A.* Biofilm formation as microbial development / G. A. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter // *Ann. Rev. Microbiol.* — 2000. — Vol. 54. — P. 49–79.
7. *Davies, D.* Understanding biofilm resistance to antibacterial agents / D. Davies // *Nat Rev Drug Discov* 2003. — Vol. 2. — P. 114–122.
8. *Knetsch, M. L.* New strategies in the development of antimicrobial coatings the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles / M. L. Knetsch, L. H. Koole // *Polymers*. — 2011. — Vol 3. — P. 340–366.
9. Биосовместимые полимерные антибактериальные покрытия с пролонгированным высвобождением ципрофлоксацина / М. А. Ярмоленко [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия*. — 2007. — Т. 52. — С. 3–7.
10. *Hetrick, E. M.* Reducing implant-related infections: active release strategies / E. M. Hetrick, M. H. Schoenfisch // *Chemical Society Reviews*. — 2006. — Vol. 35. — P. 780–789.
11. *Middleton, J. C.* Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices / J. C. Middleton, A. J. Tipton // *Biomaterials*. — 2000. — Vol. 21, № 23. — P. 2335–2346.
12. Биосовместимые полимерные антибактериальные покрытия с пролонгированным высвобождением ципрофлоксацина / М. А. Ярмоленко [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия*. — 2007. — Т. 52, № 11–12. — С. 3–7.

Поступила 07.02.2013

УДК 616.36: 611.018.26: 602.9

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ В ГЕПАТОЦИТАРНОМ НАПРАВЛЕНИИ

А. Г. Скуратов, Д. Р. Петренев, А. Н. Кондрачук, Е. В. Воропаев

Гомельский государственный медицинский университет

Цель работы: оценить фенотипические изменения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при их дифференцировке в гепатоцитарном направлении.

Материалы и методы. Костномозговые МСК; изолированные гепатоциты, выделенные методом ферментативной перфузии печени; направленная гепатогенная дифференцировка МСК согласно имеющимся и адаптированным протоколам; световая микроскопия; оценка функциональной способности гепатоцит-подобных клеток синтезировать и накапливать гликоген.

Результаты. Наблюдаемые изменения в фенотипе на протяжении этапов дифференцировки свидетельствуют о присутствии в культуре клеток, дифференцированных в гепатоцитарном направлении. МСК приобретали сначала веретенообразный фенотип, который затем сменялся полигональным с многочисленными выростами мембраны. Обнаружены кластеры гепатоцит-подобных клеток с положительной реакцией на гликоген. Наличие ростовых факторов дифференцировочных сред и выделяемых первичными гепатоцитами оказывало «стабилизирующее» влияние на культуру МСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, изолированные гепатоциты, гепатогенная дифференцировка.

PHENOTYPIC CHANGES OF MESENCHYMAL STEM CELL IN THEIR DIFFERENTIATION IN HEPATOCYTIC DIRECTION

A. G. Skuratov, D. R. Petrenyov, A. N. Kondrachuk, Y. V. Voropayev

Gomel State Medical University

Objective: to evaluate the phenotypic changes of mesenchymal stem cells (MSCs) in their differentiation in hepatocytic direction.

Materials and methods. Bone-marrow MSCs; hepatocytes isolated by enzymatic perfusion of the liver; directed hepatocytic differentiation of MSCs according to the available and adapted protocols, light microscopy, evaluation of the functional capacity of hepatocyte-like cells to synthesize and accumulate glycogen.

Results. The changes observed in the phenotype during differentiation stages indicate the presence of cells differentiated in hepatocytic direction in the culture. MSCs first gained a spindle-shaped phenotype, which then changed to a polygonal membrane with numerous appendages. The clusters of hepatocyte-like cells positive for glycogen were found. The presence of growth factors, differentiation media and allocated primary hepatocytes had a «stabilizing» effect on the culture of MSCs.

Key words: mesenchymal stem cells, isolated hepatocytes, differentiation in hepatocytic direction.

Введение

В последние годы бурно развиваются технологии по индукции дифференцировки МСК в клетки, которые обладают функциями печени

(гепатоцит-подобные клетки) Мировые научные исследования показали, что определенные комбинации ростовых факторов, а также совместное культивирование МСК как с гепато-

цитами, так и с непаренхиматозными клетками печени индуцируют их дифференцировку в гепатоцит-подобные клетки. Zhang и соавторы проводили совместное культивирование МСК со свежeweделенными крысиными гепатоцитами и показали, что такой подход более эффективен для гепатоцитарной дифференцировки этих клеток, чем просто культивирование в среде содержащей HGF (фактор роста гепатоцитов) [1]. Lange и соавторы культивировали крысиные МСК, меченные GFP (зеленый флюоресцирующий протеин), совместно с фетальными клетками печени (FLCs), и эксперимент показал, что совместное культивирование не только обеспечивало наилучшие условия для гепатоцитарной дифференцировки, но также улучшало рост и дифференцировку FLCs [2]. Chen и соавторы культивировали стромальные стволовые клетки костного мозга мышей в среде, кондиционированной гепатоцитами, и выявили дифференцировку этих клеток в гепатоцит-подобные [3]. Deng и др. проводили совместное культивирование МСК со стелатными клетками печени на различных стадиях их активации и обнаружили, что только активированные стелатные клетки, но не покоящиеся, могут влиять на дифференцировку МСК в гепатоцит-подобные клетки [4].

Эти исследования отчетливо демонстрируют решающую роль определенных цитокинов, ростовых факторов и метаболитов, секретруемых гепатоцитами и непаренхиматозными клеточными элементами печени, для направленной гепатоцитарной дифференцировки МСК. Тем не менее механизмы этого процесса остаются еще не полностью раскрытыми [5].

Цель работы

Оценить фенотипические изменения МСК при их дифференцировке в гепатоцитарном направлении, а также влияние совместного культивирования с клетками печени на эти показатели.

Материал и методы

Объектом исследования являлись лабораторные крысы линии Wistar, ядро F (возраст 6–8 месяцев, масса тела 180–200 г). МСК выделяли из костного мозга и культивировали по стандартной методике [6] с использованием среды α -MEM (SH30265.01 HyClone, 10 % FBS HyClone, 2 мМ L-глутамин; 100 Ед/мл пенициллин; 100 мг/мл стрептомицин; 0,25 мкг/мл амфотерицин В). В эксперимент брали МСК второго пассажа.

Выделение гепатоцитов. Гепатоциты были изолированы с помощью 2-стадийной ферментативной перфузии печени, описанной в работе Seglen и соавт. и адаптированной в нашей лаборатории [7]. Для этого брюшную полость наркотизированного животного вскрывали, канюлировали *v. portae*, вводили 1 мл изотонического раствора с гепарином (500 ед/мл). Вскрывали *v. cava inf.* и перфузировали печень

через канюлю в *v. portae* безкальциевым буферным раствором (9 г/л NaCl, 10 мМ HEPES, pH = 7.4) в течение 7 минут при 37,0 °С при скорости потока 30 мл в минуту. Далее перфузировали 5 минут аналогичным раствором, содержащим 0,07 % коллагеназы II (Sigma, США) при тех же условиях. Далее печень экстирпировали и переносили в стерильную чашку Петри с холодным раствором Хенкса (HBSS без фенолового красного, 14065 GIBCO; 10 мМ HEPES pH = 7.4; 100 Ед/мл пенициллин; 100 мг/мл стрептомицин; 0,25 мкг/мл амфотерицин В). С помощью скальпеля и пинцета разрушали капсулу и диспергировали паренхиму. Клеточную суспензию и фрагменты ткани пропускали через 200 μ m фильтр и дважды отмывали холодным раствором Хенкса (300 г, 5 мин.). Гепатоциты очищали от примеси эритроцитов и дебриса центрифугированием на градиенте плотности Percoll (Sigma, США). Для этого смешивали равные объемы суспензии клеток и 90 % Percoll, забуференного 20 мМ HEPES pH = 7,4, и центрифугировали при 400 g в течение 15 мин. Клетки дважды отмывали холодным раствором Хенкса центрифугированием (300 г, 5 мин.). Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева и ресуспензировали в полной среде для достижения концентрации 4×10^5 кл/мл.

Дифференцировка МСК в гепатоцит-подобные клетки. Для разработки протокола дифференцировки МСК использовали принципы, описанные в источниках [2, 8, 9, 10]. Для этого МСК второго пассажа высаживали в 6-луночные планшеты (ThinCert, GreinerBioOne) для получения конечной плотности клеток 2×10^4 кл/см². Далее последовательно в три этапа проводили инкубацию клеток в средах, содержащих комбинации дифференцировочных факторов. На этапах 2 и 3 проводили 50 % смену среды каждые 3–4-е сутки.

Совместное культивирование МСК костного мозга и гепатоцитов. Для проведения совместного культивирования МСК и первичных гепатоцитов использовали систему, состоящую из 6-луночного планшета и пластиковых вставок с мембраной с диаметром пор 0,4 μ m (ThinCert, GreinerBioOne Inc.). МСК вносили в лунки планшета для получения плотности клеток 2×10^4 кл/см². Свежeweделенные гепатоциты вносили в камеру вставки. Таким образом МСК и гепатоциты оказывались разделенными мембраной, проницаемой для растворимых факторов и среды, но предотвращающей перемещение клеток между компартаментами. Этапы культивирования и дифференцировочные среды использовали такие же, как и в протоколе направленной дифференцировки МСК.

В процессе эксперимента состояние и морфологию клеточных культур оценивали с помощью

световой инвертированной микроскопии. Для верификации дифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки оценивали их способность синтезировать и накапливать гликоген, а также концентрацию мочевины в культуральной среде.

Результаты и их обсуждение

Получение и экспансия недифференцированных МСК. Первичные МСК составляют менее 1 % от общего количества клеток костного

мозга. В этой связи популяцию МСК обогащали на основе их способности прилипать к субстрату. Для этого суспензию клеток костного мозга инкубировали 48 часов в пластиковой посуде (37 °С, 5 % CO₂) в базовой среде α -MEM для адгезирования клеток к субстрату. Далее отмывали средой Хенкса, не содержащей ионы кальция и магния, за счет чего удаляли все клеточные элементы, не прикрепленные к пластику (рисунок 1).

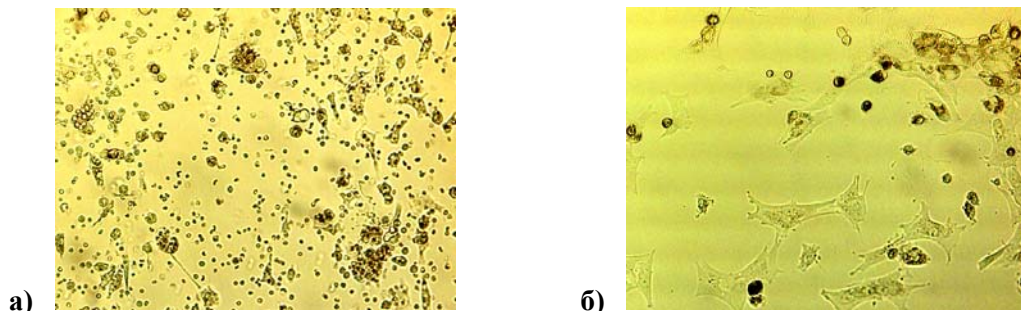


Рисунок 1 — Вид первичной культуры клеток костного мозга через 48 ч инкубирования в среде DMEM/F-12 (а) и среде α -MEM после троекратной отмывки (б) средой Хэнкса без ионов кальция и магния. Увеличение $\times 20$ (а) и $\times 40$ (б)

Дифференцировка МСК в гепатоцитарном направлении. На первом этапе дифференцировки клеток в гепатоцитарном направлении после 24 ч инкубирования клеток в среде, содержащей 1 % FBS, 3 % BSA и β FGF (10 нг/мл), наблюдали гибель и открепление от субстрата части клеточных элементов, вероятно, наиболее требовательных к составу среды и наличию ростовых факторов. Одновременно

с этим процессом наблюдали образование клеточных кластеров вокруг адгезированных к подложке элементов (рисунок 2). Процесс был наиболее выражен на 3-и сутки культивирования в условиях этой селективной среды. К окончанию первого этапа вся культура МСК была преимущественно представлена островками клеток, равномерно распределенными по площади культуральных сосудов.

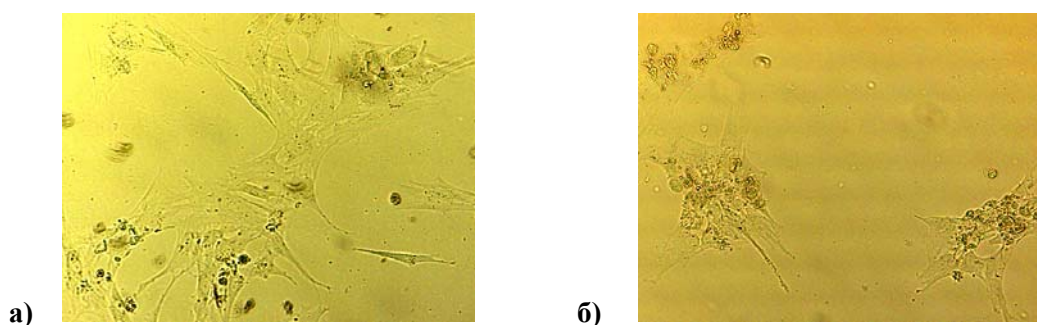


Рисунок 2 — Вид культуры МСК с кластерами клеток через 24 ч (а) и 72 ч (б) инкубации в селективной среде. Увеличение $\times 40$

Второй этап направленной дифференцировки МСК индуцировали на 3-и сутки дифференцировки посредством полной замены селективной среды на среду «Diff1». В отличие от среды, использованной на первом этапе, эта среда содержала 10 % FBS и весь коктейль ростовых факторов — β FGF (10 нг/мл), EGF (10 нг/мл), HGF (20 нг/мл). Контролем служили ячейки с аналогичной средой, но без ростовых факторов. Во всех образцах наблюдали активный рост клеток с одновременным измене-

нием морфологии клеточных элементов. МСК в присутствии ростовых факторов приобретали веретенообразную морфологию и по сравнению с контрольной культурой демонстрировали фенотип с меньшей полигональностью. Рост клеток не был равномерным по всей площади культуральных сосудов. Так, на 4-е сутки культивирования со средой «Diff1» наряду с участками конфлюэнтности (менее 50 %) наблюдали зоны практически со 100 % монослоем. Очевидно, что данный характер распределения клеточных элементов

является следствием образования клеточных кластеров на предыдущем этапе дифференцировки.

Примечательно, что в ячейках с дифференцировочной средой и с мембранными вставками, содержащими первичные гепатоциты, наблюдали формирование так называемых «фокусов адгезии» (рисунок 3). Эти участки,

сформированные клетками с распластанной морфологией, характеризовались многоярусной организацией. В их центральной части наблюдали адгезию дебриса и клеточных элементов округлой формы, что свидетельствует об изменении профиля экспрессии молекул межклеточной адгезии в этих зонах.

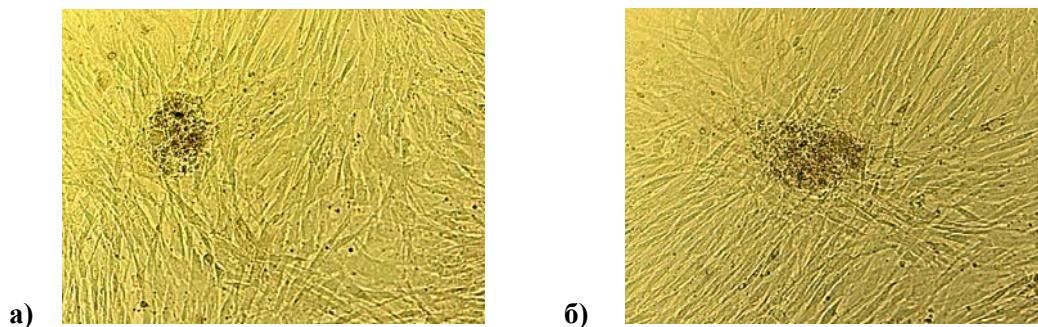


Рисунок 3 — Вид участков культур МСК с повышенной плотностью клеток и образование многоуровневой структуры с так называемыми «фокусами адгезии» в ячейках с дифференцировочной средой «Diff1» (а) и с мембранными вставками, содержащими первичные гепатоциты (б). Увеличение $\times 40$

При дальнейшем культивировании клеток в среде «Diff1» наблюдали образование монослоя практически по всей площади культуральных сосудов. Морфология клеток также претерпевала изменения, и веретенообразный фенотип сменялся полигональным с многочисленными выростами мембраны. При этом контрольная культура претерпевала значительные изменения с образованием гетерогенных структур и чередующихся участков клеток с распластанной и конденсированной морфологией. Вероятно, этот феномен обусловлен спонтанной дифференцировкой клеток в произвольном направлении.

Третий этап дифференцировки инициировали сменой среды на «Diff2», содержащую HGF (20 нг/мл), дексаметазон (0,1 μ М), 1 % ITS, никотиновую кислоту (0,9 мг/мл) и 0,1 % демитилсульфоксида. Значительных изменений морфоло-

гии клеток по сравнению с окончанием предыдущего этапа дифференцировки не наблюдали. Основные изменения были связаны с усложнением структуры многослойной культуры, отмиранием отдельных элементов и колонизацией освобожденных площадей. В большей степени эти процессы были характерны для контрольной культуры. Культура МСК с дифференцировочной средой была более стабильна по морфологическим показателям. Наличие факторов, выделяемых первичными гепатоцитами, также оказывало «стабилизирующее» влияние на культуру МСК.

К окончанию третьего дифференцированного этапа (21–23-е сутки дифференцировки, 43–45-е сутки культивирования клеток *in vitro*) в контрольной культуре без ростовых факторов наблюдали массовую гибель и открепление от субстрата (рисунок 4).

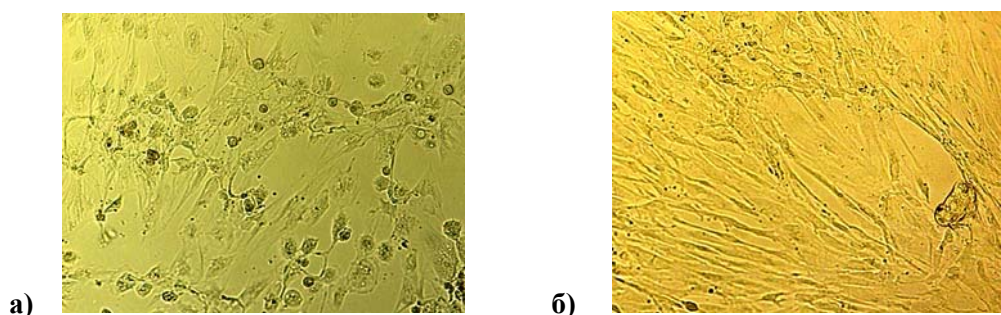


Рисунок 4 — Вид культур МСК в конце третьего этапа дифференцировки на 21-е сутки инкубации в контрольной среде (а) и среде «Diff2» (б). Увеличение $\times 40$

Образцы МСК, культивируемые в дифференцировочных средах, в эти сроки сохраняли характерный распластанный фенотип и многоуровневую структуру клеточного слоя. В от-

дельных участках культур с повышенной плотностью клеток наблюдали образование плотных сфер. Ранее исследователи из различных научных групп сообщали об образовании вторичных

структур при культивировании МСК и их направленной дифференцировке в гепатоцитарном направлении [1]. Мы предполагаем, что эти структуры подобны так называемым «эмбионидным телам», которые образуются при культивировании эмбриональных стволовых клеток.

Для идентификации этих образований мы провели специфическое окрашивание на гликоген после 24 ч инкубации образцов в среде с повышенным содержанием глюкозы. В качестве контроля использовали препараты, приготовленные из свежеизолированных гепатоци-

тов, которые также использовались для кондиционирования среды. Мелкие гранулы гликогена, находящиеся в цитоплазме гепатоцитов, дают розовое окрашивание при проведении ШИК-реакции. Аналогичное диффузное окрашивание было характерно для обнаруженных в культуре МСК образований (рисунок 5.). Таким образом, эти структуры являются кластерами гепатоцит-подобных клеток, выращенными из недифференцированных МСК и сохраняющими контакт со стромой, сформированной из недифференцированных элементов.

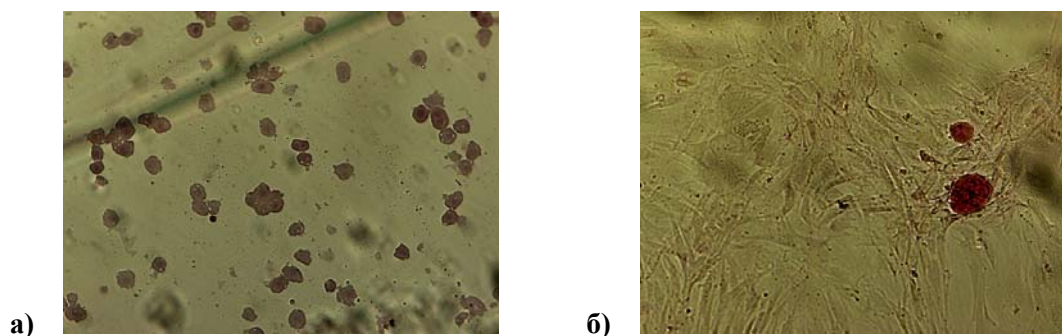


Рисунок 5 — Вид культуры первичных гепатоцитов (а) и клеточных кластеров, появившихся в культуре МСК на 20–25-е сутки гепатоцитарной дифференцировки (б) после проведения специфического окрашивания на гликоген (ШИК-реакция). Увеличение $\times 40$

Представляется важным, что формирование кластеров клеток с морфологическими и биохимическими признаками гепатоцитарной дифференцировки происходило в соответствии с «исходной» программой, то есть сначала формировался слой стромальных элементов, а лишь потом происходило формирование кластеров клеток с отличающимися морфологическими характеристиками и положительной реакцией на гликоген.

Следует также отметить, что в образцах содержащих эти клеточные образования наблюдали тенденцию к повышению уровней продукции мочевины на 5–7 % относительно контрольных культур МСК без дифференцировочных факторов, что является дополнительным критерием, подтверждающим дифференцировку МСК в выбранном направлении.

Заключение

Наблюдаемые изменения в фенотипе на протяжении этапов дифференцировки свидетельствуют о присутствии в культуре клеток, дифференцированных в гепатоцитарном направлении. МСК приобретали сначала веретенообразный фенотип, который затем сменялся полигональным с многочисленными выростами мембраны. Обнаружены кластеры гепатоцит-подобных клеток с положительной на гликоген реакцией. Наличие ростовых факторов дифференцировочных сред и выделяемых первичными гепатоцитами оказывало «стабилизирующее» влияние на культуру МСК.

Представляется важным дальнейший поиск молекулярно-генетических маркеров дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells / Q. Zhang [et al.] // *DNA Cell Biol.* — 2007. — № 26. — P. 497–503.
2. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells / C. Lange [et al.] // *World J Gastroenterol.* — 2006. — № 12. — P. 2394–2397.
3. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes / Y. Chen [et al.] // *J. Cell. Biochem.* — 2007. — № 102. — P. 52–63.
4. Hepatic stellate cells modulate differentiation of bone marrow mesenchymal cells into hepatocyte-like cells / X. Deng [et al.] // *J. Cell. Physiol.* — 2008. — № 217. — P. 138–144.
5. Clonal mesenchymal stem cells derived from human bone marrow can differentiate into hepatocyte-like cells in injured livers of SCID mice / X. R. Tao [et al.] // *J. Cell. Biochem.* — 2009. — № 108. — P. 693–704.
6. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone / H. Zhu [et al.] // *Nat. Protoc.* — 2010. — № 5(3). — P. 550–560.
7. Seglen, P. O. Preparation of rat liver cells / P. O. Seglen // *Methods Cell Biol.* — 1976. — № 13. — P. 29–83.
8. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в гепатоцитоподобные клетки in vitro / Я. И. Исайкина [и др.] // *Вести Национальной Академии Наук Беларуси.* — 2011. — № 1. — С. 10–15.
9. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells / C. Lange [et al.] // *World J Gastroenterol.* — 2005. — № 11(29). — P. 4497–4504.
10. Hepatic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: In Vitro Strategies / S. Snykers [et al.] // *In Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications, Methods in Molecular Biology.* — Vol. 698 — P. 305–314.

Поступила 22.05.2013