

## СРАВНЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫХ ПОТЕНЦИЙ ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА, ЖИРОВОЙ ТКАНИ, ВОЛОСЯНОГО СОСОЧКА И ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА

© *Е. В. Киселева*,<sup>1,2</sup> *Э. С. Чермных*,<sup>1,\*</sup> *Е. А. Воротеяк*,<sup>1</sup> *А. И. Воложин*,<sup>2</sup>  
*А. В. Васильев*,<sup>1</sup> *В. В. Терских*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва,*

*и* <sup>2</sup> *Московский государственный медико-стоматологический университет;*

*\* электронный адрес: elinachermnykh@mail.ru*

Проведен сравнительный анализ морфологических характеристик и дифференцировочных потенциалов клеток, выделенных из стромы костного мозга (СККМ), жировой ткани (СКЖТ), волосяного сосочка (ВС) и фибробластов дермы (ДФБ) человека. Все типы клеток имели фибробластоподобную морфологию. Иммуноцитохимическим анализом на поверхности СКЖТ и клеток ВС выявлены маркеры стволовых клеток CD105, CD49d и STRO-1, на СККМ не обнаружен CD49d, в популяции ДФБ отмечен низкий уровень экспрессии CD49d и STRO-1. Популяция СКЖТ, СККМ и клеток ВС человека обладают сходными потенциальными к адипо- и остеогенным дифференцировкам и при культивировании в индукционных средах изменяют фенотип, синтезируя специфические белки. Однако степень выраженности дифференцировки клеток ВС ниже, чем у популяций СКЖТ и СККМ. Мы полагаем, что исследованные клеточные популяции содержат примитивные прогениторные клетки со свойствами мезенхимных стволовых клеток (МСК).

Ключевые слова: клетки стромы костного мозга, клетки стромы жировой ткани, клетки волосяного сосочка, дифференцировка.

Принятые сокращения: ВС — волосяной сосочек, ДФБ — фибробласты дермы, МСК — мезенхимные стволовые клетки, СКЖТ — стромальные клетки жировой ткани, СККМ — стромальные клетки костного мозга, ФТС — фетальная телячья сыворотка.

В настоящее время одной из актуальных проблем в области биологии стволовой клетки является поиск и изучение различных клеточных популяций, способных дифференцироваться в заданном направлении, для использования их в терапевтических целях. Исследования последних лет показали, что большая часть тканей взрослого организма содержит пул стволовых клеток, которые проявляют высокий уровень пластичности (Mimeault et al., 2007). Известно, что стромальные клетки костного мозга (СККМ) при культивировании в специфических условиях дифференцируются в клетки костной, хрящевой, жировой, мышечной и других тканей (Bruder et al., 1997; Kopen et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Toma et al., 2002). СККМ также обладают уникальными иммуномодулирующими характеристиками: способны подавлять пролиферацию лимфоцитов *in vitro* (Le Blanc et al., 2003; Klyushnenkova et al., 2005; Vocelli-Tyndall et al., 2007) и улучшают выживание аллогенных кожных трансплантатов (Bartholomew et al., 2002). Высокий уровень пластичности и иммуномодуляторные свойства СККМ позволяют предполагать использование этих клеток в терапевтических целях. Однако количество мезенхимных стволовых клеток (МСК) очень низко — 0.001—0.010 % всей клеточной популяции взрослого костного мозга (Pittenger et al., 1999). Исследования последних лет показали наличие МСК помимо

стромы костного мозга во многих органах и тканях: в строме жировой ткани (Zuk et al., 2001; De Ugarte et al., 2003), тканях сердца (Warejcka et al., 1996), дерме (Fernandes et al., 2004), трабекулярной кости (Song et al., 2005), синовиальной мембране (De Bari et al., 2001), плаценте (Miao et al., 2006), пуповинной крови (Lee et al., 2004a) и других органах. Эти клетки представляют собой популяцию недифференцированных или малодифференцированных прогениторных клеток и являются резервом для регенерации ткани при повреждении.

С точки зрения доступности кожа является привлекательным источником взрослых стволовых клеток. Показано, что стволовые клетки дермы в условиях *in vitro* могут дифференцироваться в нейроны и мышечные клетки (Toma et al., 2001), проявляя тем самым высокий уровень пластичности. Однако из-за гетерогенности популяции дермальных клеток происхождение и фенотип мультипотентных клеток остаются невыясненными.

Клетки с высоким регенеративным потенциалом находятся в мезенхимном компартменте волосяного фолликула — волосяном сосочке (ВС). Эти клетки необходимы для индукции формирования волосяного фолликула в эмбриогенезе и поддержания его эпителиальной дифференцировки в цикле роста волоса у взрослого организма. Мезенхимные клетки волосяного фолликула являются ис-

точником стволовых клеток, участвующих в восстановлении дермы при ее повреждении (Jahoda, Reynolds, 2001). Клетки BC вибриссы крысы способны индуцировать формирование новых фолликулярных структур при контактировании с эпителием, лишенным волосных фолликулов (Oliver, 1970), а клетки BC мышцы могут давать колонии эритроидных и миелоидных клеток в условиях *in vitro* и восстанавливать гематопоз у летально облученных мышшей при трансплантации (Lako et al., 2002). Индуктивным сигналом обладают также клетки, формирующие соединительнотканную оболочку волосного фолликула, так как они способны формировать новые BC при его удалении (Oliver, 1970). Однако фибробласты интерфолликулярной дермы не обладают такими свойствами. Было также показано, что они не способны дифференцироваться в клетки костной и жировой тканей при их культивировании в индукционных средах (Zuk et al., 2001; Hoogduijn et al., 2006). Вышеизложенные данные позволяют предполагать, что клетки BC могут отличаться от фибробластов дермы и обладать дифференцировочными потенциалами.

Задача работы заключалась в проведении сравнительного анализа потенциалов к дифференцировке клеток стромы костного мозга, жировой ткани, волосного сосочка и фибробластов дермы человека.

### Материал и методика

Выделение и культивирование клеток СКМ выделяли из аспириатов костного мозга здоровых доноров, для чего проводили пункцию гребня подвздошной кости. Аспириаты разбавляли в соотношении 1 : 5 PBS (Sigma, США), содержащим 2 мМ динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma, США). Фракцию мононуклеарных клеток выделяли центрифугированием в градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma, США) при 400 g в течение 30 мин при комнатной температуре. Суспензию клеток отмывали в среде DMEM (Биолот, Россия) 3 раза. Клетки переносили в пластиковые флаконы (Greiner Bio-One, Германия) в количестве  $10^6$  кл./см<sup>2</sup> и культивировали в питательной среде DMEM, содержащей 10 % ФТС (Биолот, Россия), при 37 °C в газовой среде с 5 % CO<sub>2</sub>. Каждые 3 сут проводили смену среды.

В работе использовали СКЖТ, выделенные из липоаспириатов жировой ткани человека. СКЖТ выделяли по методу Zuk с соавторами (Zuk et al., 2001) с модификациями. Ткань промывали в солевом растворе Хэнкса (Биолот, Россия) с гентамицином (200 ед./мл), измельчали ножницами и инкубировали в растворе 0.1%-ной коллагеназы I типа (Worthington, США) при 37 °C и постоянном перемешивании в течение 90 мин. Фермент ингибировали добавлением фетальной телячьей сыворотки (ФТС) в количестве 1/10 части общего объема. Зрелые адипоциты отделяли центрифугированием при 300 g в течение 10 мин. Клеточный осадок 2 раза отмывали от коллагеназы в среде DMEM, содержащей 10 % ФТС. Суспензию клеток фильтровали через нейлоновый фильтр и центрифугировали в градиенте плотности Histopaque-1077 при 400 g в течение 30 мин при комнатной температуре для получения фракции мононуклеарных клеток. Суспензию клеток отмывали в среде DMEM 3 раза. Клетки культивировали до первого пассирования в среде DMEM, содержащей 20 % ФТС, затем культуры переводили на среду DMEM/F12 (1 : 1). (Биолот, Россия), содержащую 10 %

ФТС, и в дальнейшем культивировали в этой среде, проводя ее смену каждые 3—4 сут.

Клетки BC и фибробласты дермы (ДФБ) выделяли из кожных биоптатов, полученных в результате первичной обработки операционного поля при косметических операциях. Биоптаты промывали в растворе Хэнкса с добавлением гентамицина (200 ед./мл).

Для выделения клеток BC биоптаты кожи помещали в 0.5%-ный раствор диспазы (Sigma, США) на 14—16 ч при 4 °C. С помощью пинцета извлекали волосы вместе с волосными фолликулами. Выделенные волосы инкубировали в 0.1%-ном растворе коллагеназы I типа в среде DMEM в течение 7 ч при 37 °C. С помощью бинокулярного микроскопа отбирали BC, промывали в растворе Хэнкса, клетки ресуспендировали в среде DMEM, содержащей 10 % ФТС и 4 мМ L-глутамин, и культивировали при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

Для получения ДФБ с фрагментов кожи острым ножом срезали подкожную жировую клетчатку. Полученные лоскуты промывали PBS, помещали в 0.125%-ный раствор диспазы и инкубировали при 4 °C в течение 12 ч. После этого отделяли пинцетом эпидермис от дермы по линии базальной мембраны. Дерму промывали в PBS, измельчали ножницами до однородной массы и проводили дезагрегацию клеток в растворе 0.25%-ного трипсина (Биолот, Россия) при 37 °C в течение 60 мин. Фермент инактивировали добавлением 5 % ФТС. Полученную суспензию клеток дополнительно пипетировали и центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Полученный осадок ресуспендировали в среде Игла (Биолот, Россия), содержащей 4 мМ L-глутамин (Sigma, США) и 10 % ФТС, и рассевали в культуральные флаконы. Фибробласты культивировали при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>, смену среды проводили через каждые 3—4 сут, культуры пассировали при достижении конфлюэнтного монослоя.

Индукция адипогенной дифференцировки. Для выявления способности дифференцироваться в адипоциты клетки культивировали в индукционной среде следующего состава: среда DMEM/F12, 10 % ФТС, 0.5 мМ изобутил-метилксантина (Sigma, США), 1 мкМ дексаметазона (Sigma, США), 10 мкМ инсулина (Sigma, США) и 200 мкМ индометацина (Sigma, США). Смену среды проводили каждые 3 сут в течение 2 нед, затем клетки фиксировали. Адипогенную дифференцировку выявляли гистохимическим окрашиванием на нейтральные жиры красителем Oil Red O (Sigma, США) и иммуногистохимическим анализом на наличие маркерного белка зрелых адипоцитов — лептина (Chemicon, США).

Индукция остеогенной дифференцировки. Для остеогенной дифференцировки клетки высаживали в концентрации  $2.5 \cdot 10^4$  кл./см<sup>2</sup> и культивировали до достижения конфлюэнтного монослоя. Затем среду культивирования меняли на индукционную среду следующего состава: среда DMEM/F12, 10 % ФТС, 0.01 мкМ 1,25-дигидроксивитамина D<sub>3</sub> (Sigma, США), 50 мкМ аскорбат-2-фосфата (Sigma, США) и 10 мМ β-глицерофосфата (Sigma, США); смену проводили каждые 3 сут. Остеогенную дифференцировку определяли гистохимическим окрашиванием на активность щелочной фосфатазы (Chemicon, США), иммуногистохимическим анализом выявления специфичных остеогенных белков — остеокальцина и остеоонтина (Chemicon).

Для гистохимических и иммуногистохимических исследований клетки фиксировали в течение 30 мин при комнатной температуре в 4%-ном растворе параформаль-

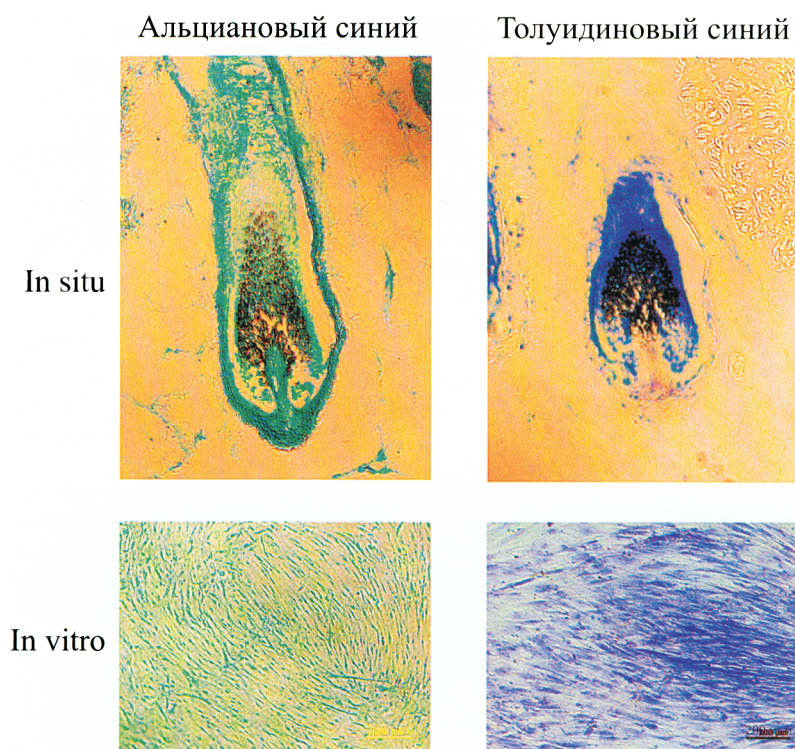


Рис. 1. Характеристика клеток волосяного сосочка.

Окраска толуидиновым синим и альциановым синим. In situ: ок. 10×, об. 4×; in vitro: ок. 10×, об. 10×.

дегида (Sigma, США). Затем промывали 3 раза по 10 мин PBS, наносили первые антитела и инкубировали при 4 °С в течение 16—19 ч. Далее препараты отмывали в 3 сменах PBS и инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромами серии Alexa (Molecular probes, США), в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки в PBS препараты заключали в среду Vectashield с DAPI (Vector, США) и изучали под микроскопом Olympus (Япония).

Клетки подсчитывали по фотографиям 10 полей зрения, сделанных при увеличении объектива 10× и окуляра 10×. Долю положительно окрашенных по исследуемому маркеру клеток выражали в процентах по отношению к общему числу клеток. При статистической обработке результатов оценивали стандартное отклонение от значения средней величины.

## Результаты

Специфические антигены клеток ВС до сих пор не выявлены, однако существует ряд гистохимических маркеров, позволяющих отличить эти клетки от ДФб. Например, специфические компоненты внеклеточного матрикса, синтезируемые клетками ВС, такие как кислые и нейтральные мукополисахариды, могут быть выявлены красителями толуидиновым синим и альциановым синим (Wu et al., 2005). С помощью этих красителей мы окрасили клетки ВС in situ и in vitro (рис. 1). При обработке альциановым синим (pH 2.5) парафиновых срезов кожи человека было обнаружено голубоватое окрашивание как ВС, так и соединительнотканной оболочки волосяного фолликула. Толуидиновым синим (pH 2.0) клетки ВС окрашива-

лись в сиреневый цвет, проявляя, таким образом, метакроматические свойства. Культивируемые клетки ВС окрашивались альциановым синим в голубоватый цвет, а толуидиновым синим — в сиреневый цвет (рис. 1), тогда как ДФб не окрашивались этими красителями. Данные результаты свидетельствуют о том, что клетки ВС в культуре все еще сохраняют способность синтезировать специфические компоненты внеклеточного матрикса, что подтверждает принадлежность выделенных нами клеток к клеткам ВС.

Ранее было показано, что индуктивный сигнал ВС исчезает в процессе культивирования (Weinberg et al., 1993), поэтому в данной работе исследовали дифференцировочные потенции клеток 2-го пассажа.

В результате анализа поверхностных антигенов (рис. 2) на СККМ выявлены CD105, STRO-1, но не CD49d. На СКЖТ обнаружены все исследованные маркеры, клетки ВС также синтезировали CD49d, но имели низкий уровень экспрессии CD105 и STRO-1 по сравнению с популяциями СККМ и СКЖТ. На ДФб по сравнению со СКЖТ и клетками ВС CD49d представлен в меньшем количестве, тогда как STRO-1 выявляется только на поверхности единичных клеток, а CD105 вообще не обнаруживается.

При культивировании в адипогенной индукционной среде в культурах СККМ и СКЖТ наблюдали морфологические изменения клеток: появление липидных капель, которые окрашивались красителем Oil Red O, в цитоплазме более 90 % клеток ( $92 \pm 6.7$ ) (рис. 3). С помощью иммуногистохимического анализа показано, что СККМ и СКЖТ начинали синтезировать лептин. Адипогенная дифференцировка ДФб и клеток ВС была менее выражена по сравнению со СККМ и СКЖТ. Отложение липид-



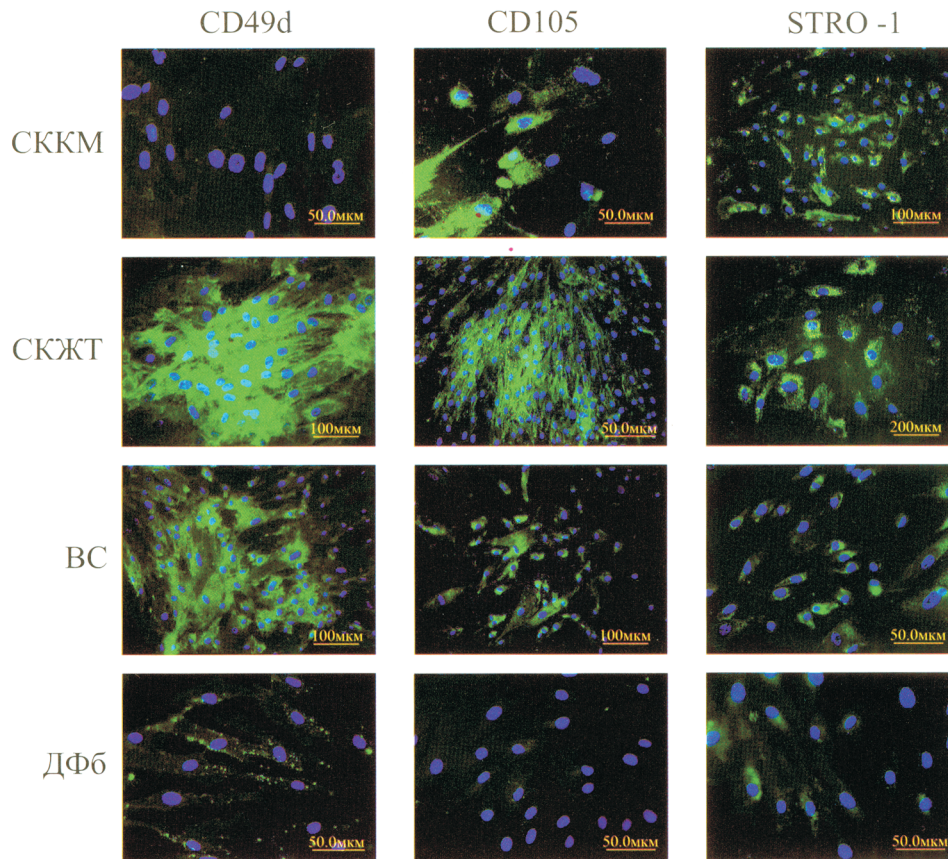


Рис. 2. Иммуногистохимический анализ экспрессии маркеров стволовых клеток CD49d, CD105 и STRO-1 в популяциях СККМ, СКЖТ, клеток ВС и ДФб.

Ядра клеток окрашены DAPI.

ных капель в цитоплазме и синтез лептина наблюдали только в 20—30 % клеток ВС и ДФб (рис. 3). При культивировании в контрольной среде (DMEM и 10 % ФТС) в СККМ, клетках ВС и ДФб лептин не выявлен, тогда как в популяции СКЖТ лептин обнаружен менее чем в 5 % ( $3.9 \pm 0.8$ ) клеток.

Для оценки степени дифференцировки клеток в остеогенном направлении были выбраны следующие методические подходы: гистохимическая окраска на активность щелочной фосфатазы, окраска на кальцификацию внеклеточного матрикса (краситель Alizarin Red S) и иммуногистохимическое выявление остеогенных белков — остеопонтин и остеоонектин. Через 3 нед культивирования в индукционной среде показано, что СККМ и СКЖТ приобретали фенотип клеток костной ткани: образовывали многослойную культуру с формированием клеточных агрегатов, синтезировали плотный внеклеточный матрикс, который подвергался кальцификации. Минерализация внеклеточного матрикса была наиболее выражена в области агрегатов клеток (узлов кальцификации), а также распространялась на многослойные участки культуры. В клетках отмечены высокая активность щелочной фосфатазы, а также обнаружены специфические белки остеопонтин и остеоонектин (рис. 4). При культивировании в контрольной среде СКЖТ и СККМ только в единичных клетках были представлены специфические остеогенные белки.

Клетки ВС при культивировании в остеогенной среде также образовывали многослойную культуру с немногочисленными агрегатами. Кальцификация внеклеточного

матрикса обнаружена только в области агрегатов клеток. Также обнаружены остеогенные белки, однако в меньшем количестве, чем в культурах СККМ и СКЖТ. В контрольной среде небольшое количество клеток ВС спонтанно дифференцировалось в клетки костной ткани.

При культивировании в остеогенной среде ДФб образовывали плотный монослой, но не кальцифицировали матрикс (отрицательное окрашивание красителем Alizarin Red S), в них не выявлено высокой активности щелочной фосфатазы (рис. 4). Иммуногистохимическое окрашивание показало, что остеопонтин и остеоонектин присутствуют в единичных клетках. Такое же количество накапливающих остеогенные маркеры ДФб наблюдали при культивировании клеток в контрольной среде.

## Обсуждение

Клеточные технологии являются эффективными способами лечения различных заболеваний. Так, например, использование МСК из костного мозга позволяет добиваться положительного эффекта при лечении заболеваний, связанных с нарушением остеогенеза (Кос, Lazarus, 2001). Во взрослом организме в разных тканях обнаруживают клетки с высоким регенеративным потенциалом и характеристиками МСК.

В настоящей работе мы впервые попытались оценить и сравнить потенции СККМ, СКЖТ и клеток ВС дифференцироваться в клетки костной и жировой тканей при их культивировании в индукционных средах. Поскольку



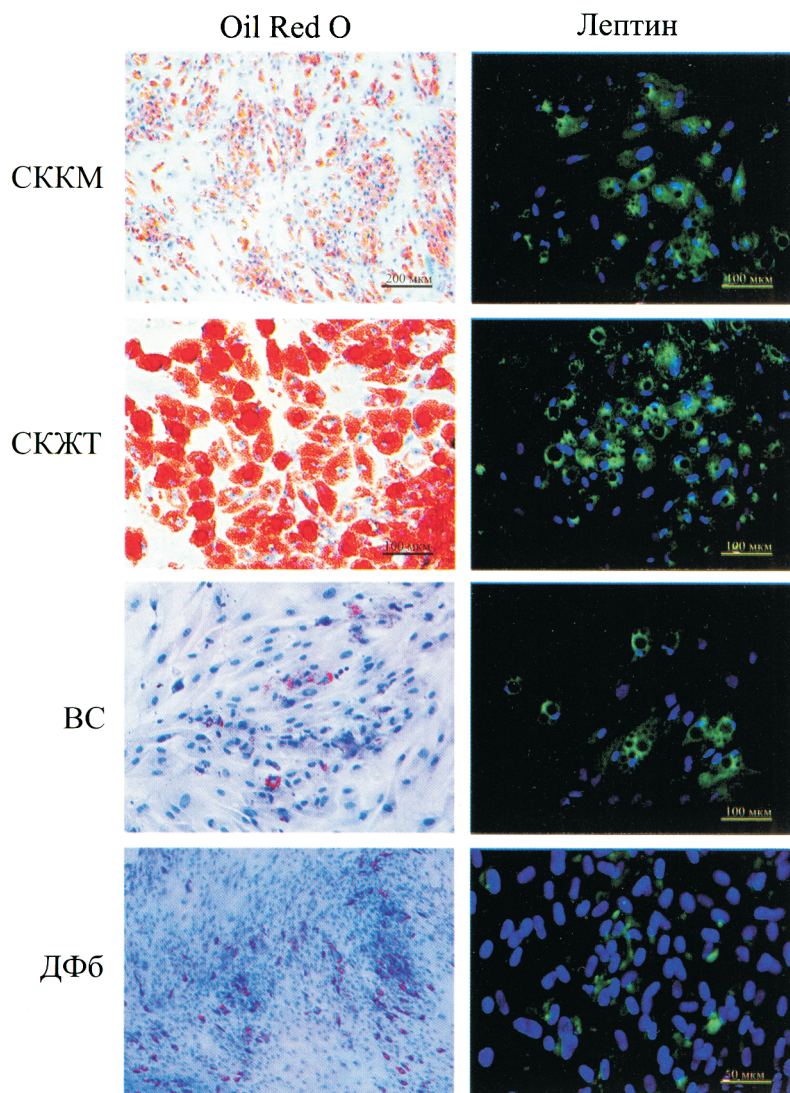


Рис. 3. Адипогенная дифференцировка популяций СККМ, СКЖТ, клеток ВС и ДФб.

Окраска на нейтральные жиры красителем Oil Red O и иммунофлуоресцентное выявление маркера зрелых адипоцитов — лептина.

СКЖТ обладают фибробластоподобной морфологией и выделяются из стромы жировой ткани, а ВС является производным дермы, то в качестве отрицательного контроля нами были выбраны выделенные из биоптатов кожи ДФб человека.

Анализ поверхностных маркеров выявил сходные черты СККМ и СКЖТ: синтез CD105, STRO-1, что согласуется с данными литературы (Zuk et al., 2002; Lee et al., 2004b). Однако, по полученным данным, в отличие от СКЖТ в популяции СККМ не обнаруживается поверхностный маркер CD49d. Данные по присутствию этого маркера на поверхности СКЖТ и СККМ противоречивы: некоторые исследователи обнаруживают его в обеих популяциях клеток (Gronthos et al., 2001), другие же — только на поверхности СКЖТ (Zuk et al., 2002). Тем не менее сходный профиль экспрессии маркеров, представленных на поверхности мультипотентных клеток из костного мозга и жировой ткани, дает основание предполагать, что СКЖТ и СККМ представляют собой субпопуляции МСК, заселенных в ходе онтогенеза в разные ткани. Клетки ВС, как и СКЖТ, синтезировали CD49d, однако синтез марке-

ров STRO-1 и CD105 был менее выражен. На поверхности ДФб эти маркеры выявлены в еще меньшем количестве, чем на клетках ВС, тогда как CD105 не обнаружен вовсе. Таким образом, можно сказать, что СККМ, СКЖТ и клетки ВС обладают сходным поверхностным фенотипом, значительно отличающимся от фенотипа популяции ДФб.

Как было показано, что СККМ и СКЖТ дифференцировались в адипоциты в одинаковой мере, что подтверждают данные ряда исследований (Zuk et al., 2002; De Ugarte et al., 2003; Lee et al., 2004a, 2004b). Клетки, выделенные из кожи — клетки ВС и ДФб, — проявляли одинаковые дифференцировочные потенции при культивировании в адипогенной среде: лишь часть клеток в популяциях ДФб и ВС имела признаки зрелых адипоцитов. Эти данные согласуются с результатами работы Кумаса с соавторами (Koumas et al., 2003), демонстрирующими, что в гетерогенной по экспрессии Thy-1 (CD90) популяции фибробластов человека способны дифференцироваться в адипоциты только фибробласты, не экспрессирующие этого маркера.

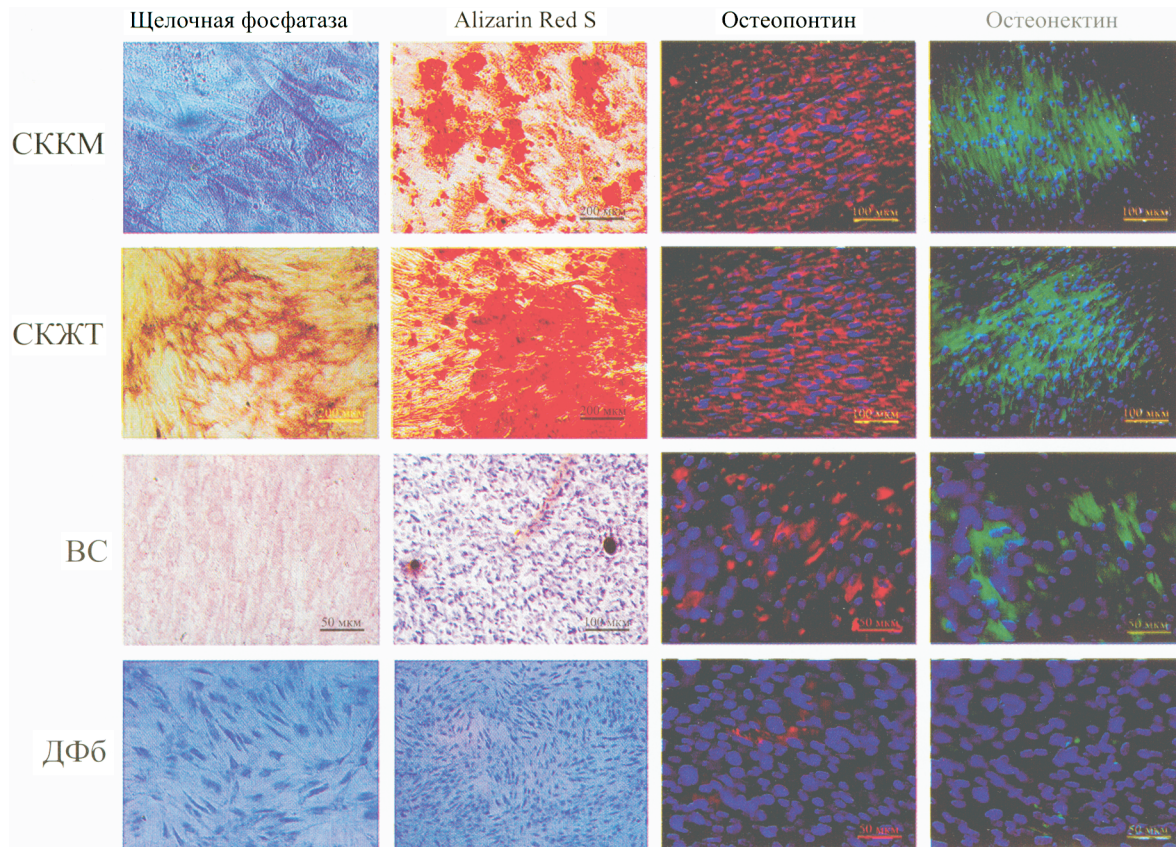


Рис. 4. Остеогенная дифференцировка популяций СККМ, СКЖТ, клеток ВС и ДФб.

Окраска на активность щелочной фосфатазы, кальцификацию внеклеточного матрикса красителем Alizarin Red S и иммунофлуоресцентное выявление остеогенных белков — остеопонтина и остеонектина. ДФб имели отрицательную окраску на активность щелочной фосфатазы, на рисунке ядра ДФб окрашены гематоксилином.

Спонтанной дифференцировкой клеток ВС в клетки жировой ткани не наблюдалось. Однако существуют данные о способности первичных культур клеток ВС вибриссы крысы спонтанно дифференцироваться в адипо- и остеогенном направлениях (Jahoda et al., 2003). В этой работе также показано, что при культивировании в соответствующей индукционной среде все клоны клеток ВС вибриссы клетки дифференцировались в адипогенном направлении. Различия между этими данными и нашими результатами могут быть связаны с различиями в объектах исследований (Jahoda et al., 2003; Hoogduijn et al., 2006). Известно, что существуют различия между МСК костного мозга человека и крысы. Так, культивируемые СККМ человека не проявляют теломеразной активности (Zimmermann et al., 2003) и их пролиферативные способности *in vitro* ниже, чем у СККМ крысы (Baxter et al., 2004).

В работе показано, что популяции СКЖТ, СККМ, клеток ВС (но не ДФб) при культивировании в индукционной среде проявляют свойства костной ткани: клетки синтезируют и минерализуют внеклеточный матрикс, накапливают специфичные для остеогенеза белки. Однако клетки ВС обладали меньшими потенциальными к дифференцировке по сравнению с популяциями СККМ и СКЖТ.

Ранее было показано, что клетки ВС экспрессируют ген остеопонтина, активность которого зависит от стадии роста волоса, при этом в культуре ДФб крысы экспрессии гена остеопонтина не обнаружено (Yu et al., 2001). В то же время в другом исследовании только в 1 из 4 клонов

клеток ВС крысы были отмечены небольшие зоны кальцификации внеклеточного матрикса (Jahoda et al., 2003). Есть данные о том, что стволовые клетки ВС вибриссы крысы имеют пролиферативные характеристики и профиль экспрессии поверхностных маркеров, подобные СККМ крысы. Клетки волосяного фолликула и СККМ крысы обладают одинаковыми потенциальными к адипо- и остеогенной дифференцировке, но некоторые различия обнаружены в случае хондро- и миогенеза (Hoogduijn et al., 2006).

В данной работе не выявлено явных признаков остеогенной дифференцировки в культуре ДФб. Однако в другом исследовании (Hee et al., 2006) обнаружено, что при культивировании ДФб на подложке из  $\beta$ -трикальцийфосфата в присутствии витамина  $D_3$  происходит дифференцировка в остеогенном направлении, а культивирование ДФб в индукционной среде, не содержащей фетальной сыворотки, усиливает экспрессию генов маркеров остеогенной дифференцировки.

Таким образом, в работе показано, что клетки стромы жировой ткани, костного мозга и ВС человека обладают схожими потенциальными к адипо- и остеогенной дифференцировке и при культивировании в соответствующих индукционных средах изменяют фенотип, синтезируя специфические белки. Однако уровень дифференцировки клеток ВС ниже, чем у популяций СКЖТ и СККМ. Мы полагаем, что исследованные клеточные популяции содержат примитивные прогениторные клетки со свойствами МСК.



Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00611-а), Министерства образования и науки РФ (государственный контракт № 02.512.11.2096) и ОАО Завода экологической техники и экопитания «ДИОД».

### Список литературы

- Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R., Moseley A., Hoffman R. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp. Hematol.* 30 : 42—48.
- Baxter M. A., Wynn R. F., Jowitt S. N., Wraith J. E., Fairbairn L. J., Bellantuono I. 2004. Study of telomere length reveals rapid of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. *Stem. Cells.* 22 : 675—682.
- Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Spagnoli G., Braccini A., Bouc-henaki M., Ceredig R., Pistoia V., Martin I., Tyndall A. 2007. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes *in vitro*. *Rheumatology (Oxford)*. 46 : 403—408.
- Bruder S. P., Jaiswal N., Haynesworth S. E. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* 64 : 278—294.
- De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F. P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Reum.* 44 : 1928—1942.
- De Ugarte D. A., Morizono K., Elbarbary A., Alfonso Z., Zuk P. A., Zhu M., Dragoo J. L., Ashjian P., Thomas B., Ben-haim P., Chen I., Fraser J., Hedrick M. H. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cell Tissue Organs.* 174 : 101—109.
- Fernandes K. J., McKenzie I. A., Mill P., Smith K. M., Akhavan M., Barnabé-Heider F., Biernaskie J., Junek A., Kobayashi N. R., Toma J. G., Kaplan D. R., Labosky P. A., Rafuse V., Hui C. C., Miller F. D. 2004. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat. Cell Biol.* 6 : 1082—1093.
- Gronthos S., Franklin D. M., Leddy H. A., Robey P. G., Storms R. W., Gimble J. M. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 189 : 54—63.
- Hee C. K., Jonikas M. A., Nicoll S. B. 2006. Influence of three-dimensional scaffold on the expression of osteogenic differentiation markers by human dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 27 : 875—884.
- Hoogduijn M. J., Gojup E., Genever P. G. 2006. Comparative characterization of hair follicle dermal stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Develop.* 15 : 49—60.
- Jahoda C. A., Reynolds A. J. 2001. Hair follicle dermal sheath cells: unsung participants in wound healing. *Lancet.* 358 : 1445—1448.
- Jahoda C. A., Whitehouse J., Reynolds A. J., Hole N. 2003. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp. Dermatol.* 12 : 849—859.
- Klyushnenkova E., Mosca J. D., Zernetkina V., Majumdar M. K., Beggs K. J., Simonetti D. W., Deans R. J., McIntosh K. R. 2005. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J. Biomed. Sci.* 12 : 47—57.
- Koc O. N., Lazarus H. M. 2001. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant.* 27 : 235—239.
- Kopen G. C., Prockop D. J., Phinney D. G. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 10 711—10 716.
- Koumas L., Smith T. J., Feldon S., Blumberg N., Phipps R. P. 2003. Thy-1 expression in human fibroblasts subset defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotype. *Amer. J. Pathol.* 163 : 1291—1300.
- Lako M., Armstrong L., Carns P. M., Harris S., Hole N., Jahoda C. A. 2002. Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system. *J. Cell Sci.* 115 : 3967—3974.
- Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S. E., Ringden O. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* 57 : 11—20.
- Lee O. K., Kuo T. K., Chen W. M., Lee K. D., Hisieh S. L., Chen T. H. 2004a. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 103 : 1669—1675.
- Lee R. H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H. S., Suh K., Bae Y. C., Jung J. S. 2004b. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol. Biochem.* 14 : 311—324.
- Miao Z., Jin J., Chen L., Zhu J., Huang W., Zhao J., Qian H., Zhang X. 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Int.* 30 : 681—687.
- Mimeault M., Hauke R., Batra S. K. 2007. Stem cells: a revolution in therapeutics — recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82 : 252—264.
- Oliver R. F. 1970. The induction of hair follicle formation in the adult hooded rat by vibrissa dermal papillae. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 23 : 219—236.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284 : 143—147.
- Song L., Young N. J., Webb N. E., Tuan R. S. 2005. Origin and characterization of multipotential mesenchymal stem cells derived from adult human trabecular bone. *Stem Cell Develop.* 14 : 712—721.
- Toma C., Pittenger M. F., Cahill K. S., Byrne B. J., Kessler P. D. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* : 93—98.
- Toma J. G., Akhavan M., Fernandes K. J., Barnabé-Heider F., Sadikot A., Kaplan D. R., Miller F. D. 2001. Isolation of multipotent adult cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 3 : 778—784.
- Warejcka D. J., Harvey R., Taylor B. J., Young H. E., Lucas P. A. 1996. A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes. *J. Surg. Res.* 62 : 233—242.
- Weinberg W. S., Goodman L. V., George C., Morgan D. L., Ledbetter S., Yuspa S. H., Lichti U. 1993. Reconstruction of hair follicle development *in vivo*: determination of follicle formation, hair growth, and hair quality by dermal cells. *J. Invest. Dermatol.* 100 : 229—236.
- Wu J. J., Liu R. Q., Lu Y. G., Zhu T. Y., Cheng B., Men X. 2005. Enzyme digestion to isolate and culture human scalp dermal papilla cells: a more efficient method. *Arch. Dermatol. Res.* 297 : 60—67.
- Yu D. W., Yang T., Sonoda T., Gong Y., Cao Q., Gaffney K., Jensen P. J., Freedberg I. M., Lavker R. M., Sun T. T. 2001. Osteopontin gene is expressed in the dermal papilla of pelage follicles in a hair-cycle-dependent manner. *J. Invest. Dermatol.* 117 : 1554—1558.
- Zimmermann S., Voss M., Kaiser S., Kapp U., Waller C. F., Martens U. M. 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia.* 17 : 1146—1149.
- Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose is a source of multipotent stem cells. *Mol. Cell.* 13 : 4279—4295.
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7P. 211—228.

COMPARISON OF FIBROBLASTS-LIKE CELL DIFFERENTIATION CAPACITIES  
OF HUMAN BONE MARROW, ADIPOSE TISSUE, HAIR PAPILLA AND DERMAL FIBROBLASTS

*E. V. Kiseleva,<sup>1,2</sup> E. S. Chermnykh,<sup>1,\*</sup> E. A. Vorotelyak,<sup>1</sup> A. I. Volozhin,<sup>2</sup> A. V. Vasiliev,<sup>1</sup> V. V. Terskikh<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow,  
and <sup>2</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry;  
\* e-mail: elinachermnykh@mail.ru

We compared the morphology and differentiation characteristics of the human cells from bone marrow, adipose tissue, hair papilla and skin dermis. All cell types showed fibroblastic morphology. Immunofluorescent analysis showed that adipose tissue derived stem cells (ADAS) and hair papilla cells (HPC) expressed CD105, CD49d and STRO-1, bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) were absent for CD49, dermal fibroblasts (DFb) expressed CD49 and STRO-1 at low level. Populations of ADAS, BMSC and HPC had similar capacities to lipid and bone differentiation. Following exposure to appropriate induction stimuli, these cells changed phenotype and expressed specific cell markers. However, the rate and extent of HPC differentiation were lower in comparison with populations of ADAS and BMSC. We propose that all investigated cell populations contain primitive progenitor cells with mesenchymal stem cell properties.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue derived stem cells, hair papilla cells, differentiation.

---