

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНТИГЕННОГО ПРОФИЛЯ, ОСТЕОГЕННЫХ И АДИПОГЕННЫХ ПОТЕНЦИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПЕЧЕНИ ЗАРОДЫШЕЙ И КОСТНОГО МОЗГА ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

© М. Н. Кожевникова,¹ А. С. Микаелян, В. И. Старостин

*Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва;
¹электронный адрес: mn_kozhevnikova@mail.ru*

Сравнительная характеристика мезенхимных стромальных клеток (МСК) из костного мозга и зародышевой печени представляет исключительный интерес в связи с выполнением этими органами сходной функции создания кроветворного микроокружения в разные периоды онтогенеза. Известно, что МСК в составе кроветворной стромы принимают участие в формировании «ниши» для кроветворных стволовых клеток. Не исключается гистогенетическое родство МСК из этих двух кроветворных органов. Анализ антигенного профиля с использованием иммуноцитохимии и ПЦР-анализа подтвердил принадлежность изучаемых клеточных популяций к МСК и отсутствие примесей кроветворных, лимфоидных и эндотелиальных клеток начиная со 2-го пассажа. Сравнительный анализ экспрессии маркеров остеогенной и адипогенной дифференцировок показал, что МСК из зародышевой печени обладают более слабыми потенциальными к адипогенезу и крайне низкой способностью к терминальной остеогенной дифференцировке в отличие от выраженных адипо- и остеогенных потенциальностей МСК из костного мозга половозрелых животных. Сходный клеточный фенотип и неодинаковые дифференцировочные потенциалы в сравнимых экспериментальных условиях культивирования, вероятно, связаны с различием в программах пре- и постнатального гистогенеза этих клеток.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, костный мозг, зародышевая печень, пре- и постнатальное развитие, остеогенез, адипогенез.

Принятые сокращения: ЗП — зародышевая печень, КМ — костный мозг, КСК — кроветворные стволовые клетки, МСК — мезенхимные стромальные клетки.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) в настоящее время рассматриваются как мультипотентные тканеспецифические стволовые и родоначальные клетки взрослого организма, способные к направленной дифференцировке в определенные типы клеток соединительной ткани, такие как остеобласты, хондробласты, адипоциты и стромальные клетки, создающие кроветворное микроокружение (Dominici et al., 2006).

Впервые МСК выделены Фриденштейном и соавторами из костного мозга (КМ) половозрелых животных и описаны как единицы, образующие колонии фибробластов КОЕ-ф *in vitro* (Friedenstein et al., 1976).

В официальном постановлении Международного общества клеточной терапии (Dominici et al., 2006) определены три минимальных критерия для МСК: адгезия к пластику в стандартных культуральных условиях, экспрессия поверхностных антигенов CD90, CD105, CD73 и наличие потенциальности к множественной дифференцировке.

МСК обнаружены в различных органах и тканях взрослого организма, таких как жировая ткань, надкостница, сухожилия, стенки сосудов, синовиальная мембрана и некоторые другие. Тем не менее основным источником этих клеток на протяжении всего постнатального онтогенеза является КМ. МСК также найдены в

кроветворной строме эмбриональных органов гемопоэза, в частности в зародышевой печени (ЗП), основного транзитного органа миелоидного кроветворения в эмбриогенезе. Присутствие МСК в составе стромы кроветворных органов в разные периоды онтогенеза тесным образом связано с исключительной ролью этих клеток и их производных в формировании и поддержании кроветворного микроокружения, так называемой ниши кроветворной стволовой клетки (КСК) (Metcalf, Moore, 1971; Van Den Heuvel et al., 1987; Mendes et al., 2005). Не исключаются возможное гистогенетическое родство между популяциями МСК из ЗП и КМ половозрелых животных, а также последовательная миграция этих клеток из одних кроветворных органов в другие в ходе онтогенеза. Такое предположение косвенно подтверждается исследованиями динамики численности других тканеспецифических стволовых клеток — кроветворных (КСК) — в желточном мешке, ЗП, селезенке и КМ, которые выявили четкую корреляцию с динамикой содержания МСК в перечисленных эмбриональных органах (Van den Heuvel et al., 1987). МСК найдены в циркулирующей крови в пренатальном онтогенезе, что также свидетельствует в пользу данной гипотезы (Campagnoli et al., 2001; Mendes et al., 2005). Необходимо отметить, что данные о нахождении МСК в

кровотоке взрослого организма недостаточны и требуют дальнейших подтверждений (Lazarus et al., 1997; Wexler et al., 2003; Meirelles et al., 2006). Широкое распространение МСК в различных органах и тканях взрослого организма и отсутствие однозначных данных о наличии этих клеток в периферической крови половозрелых животных, возможно, связаны с преимущественной миграцией МСК в эмбриональном периоде развития. Впрочем, это утверждение требует специального доказательства.

Данные последних лет показывают, что КСК из ЗП и КМ половозрелых животных обладают неодинаковыми функциональными и иммунофенотипическими характеристиками, несмотря на их общее гистогенетическое происхождение (Kim et al., 2007). Есть основания предполагать, что и МСК из ЗП и КМ также имеют различия в антигенном профиле и потенциях к дифференцировке. В частности, показано, что МСК из указанных источников различаются по экспрессии целого ряда белков цитоскелета, клеточной адгезии, рецепторов и др. (Charbord et al., 2002; Gotherstrom et al., 2005; Chateauxvieux et al., 2007; Guillot et al., 2007). Вместе с тем сведения о дифференцировочных потенциях МСК в составе ЗП неполны и противоречивы. Рядом авторов подтверждена способность этих клеток дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях (Campagnoli et al., 2001; Gotherstrom et al., 2003, 2005; Guillot et al., 2007), другими же исследователями наличие таких множественных потенций ставится под сомнение (Anker et al., 2003; Fromiguet et al., 2008). Также остаются слабо изученными молекулярно-генетические механизмы дифференцировки печеночных МСК, для полного понимания которых необходимо сравнительное исследование экспрессии генов, регулирующих ключевые этапы остео-, адипо- и хондрогенеза в этих клетках. В нашем исследовании мы анализировали два направления дифференцировки МСК, приводящих в конечном счете к развитию двух типов клеток — остеоцитов и адипоцитов, чьи функции *in vivo* достаточно разобщены. Остеогенные клетки причисляются к мезанцистам, выполняющим прежде всего опорную функцию вместе с продуцируемым ими межклеточным веществом, тогда как адипоцитам приписывается преимущественно трофическая функция.

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования — сравнительный молекулярно-генетический и иммунофенотипический анализ антигенного профиля, остеогенных и адипогенных потенций МСК из ЗП и зрелого КМ крыс.

Материал и методика

Используемые реактивы. В работе были использованы среды для культивирования α -МЕМ без дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов и 199 (Sigma, США), L-глутамин (Sigma, США), сыворотка плодов коровы (Биолот, Россия), пенициллин и стрептомицин (HyClone, США), PBS, модифицированный Дульбекко (Sigma, США), 0.25%-ный раствор трипсина (Биолот, Россия), 1 мМ ЭДТА (Биолот, Россия), дексаметазон (Sigma, США), фосфат аскорбиновой кислоты (Fluka, Германия), β -глицерофосфат (Sigma, США), индометацин (Sigma, США), инсулин (Sigma, США), ализариновый красный S (Sigma, США), жировой красный O (Sigma, США), судан III и IV, набор «Alkaline Phosphatase» (Sigma, США), раствор гематоксилина (Sigma, США), первые моноклональные антитела к CD90 (Abcam, Великобрита-

ния), CD73 (BD Pharmingen, США), CD45 (BioLegend, США), CD34 (Santa Cruz, США), остеокальцину (QED Bioscience, США), коллагену типа I (Sigma, США) и поликлональные антитела к CD144 (Abcam, Великобритания), костному сиалопротеину (Chemicon, США), Osterix (Abcam, Великобритания), Runx2 (CeMines, США), PPAR δ (Cayman Chemical, США) и ALBP (Abcam, Великобритания), вторые антитела, меченные флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 или 568 (Invitrogen, США), Тритон X-100 (Fluka, Германия), Твин 20 (Ferak, Германия), глицерин с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Vector, США), TRI[®] Reagent (Sigma, США), обратная транскриптаза M-MLV, олиго(dT)₁₅-праймеры (Силекс М, Россия), ДНКаза «Turbo» (Ambion, США), ColoredTaq-полимераза (Силекс М, Россия), бромистый этидий (Sigma, США), агароза (Amresco, США).

Получение и культивирование МСК крысы. В работе использовали неинбредных крыс Wistar в возрасте 3—4 мес и массой 150—200 г, а также зародышей крыс на 16-е сут эмбрионального развития. Наступление беременности определяли по составу влагалищного мазка. Крыс умерщвляли с использованием хлороформа. Для получения культуры МСК из КМ бедренные и большеберцовые кости (от 3—4 крыс) иссекали, освобождали от мягких тканей и после отсечения эпифизов вымывали содержимое диафизов культуральной средой α -МЕМ с помощью шприца объемом 10 см³. Полученные образцы КМ суспендировали под давлением с помощью шприца и пропускали через фильтр, $d = 40$ мкм (BD Biosciences, США). После подсчета числа клеток суспензию ($5 \cdot 10^6$ кл./мл) помещали в культуральные флаконы площадью 75 см² (Greiner, Германия) и культивировали в стандартной ростовой среде α -МЕМ с добавлением 2 мМ L-глутамина, 10 % сыворотки плодов коровы, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в CO₂-инкубаторе при 37 °С с 5 % CO₂. Спустя 24 ч после посева первичной культуры неприкрепившиеся клетки удаляли, а прикрепившиеся дважды промывали PBS (рН 7.2—7.4) и проводили смену среды. В дальнейшем среду меняли через 3—4 сут в течение 14—15 сут. При достижении 90—95%-ного конфлюэнтного монослоя клетки пересевали по культуральным флаконам ($3 \cdot 10^4$ кл./мл) с использованием 0.25%-ного раствора трипсина в 1 мМ ЭДТА и продолжали культивировать в ростовой среде без добавления антибиотиков до очередного достижения 90—95%-ной конфлюэнтности.

Для получения культуры МСК из зародышевой печени беременным крысам вскрывали брюшную полость, иссекали рога матки и помещали их в охлажденную культуральную среду 199 с антибиотиками. Под бинокулярной лупой извлекали зародыши, выделяли печень (от 12 до 44 образцов), готовили клеточную суспензию механическим дезагрегированием с помощью шприца объемом 10 см³ и пропускали через фильтр, $d = 40$ мкм (BD Biosciences, США). Клеточную суспензию трижды отмывали центрифугированием в среде α -МЕМ. После последнего центрифугирования клетки ресуспендировали, помещали в культуральные флаконы площадью 75 см² (Greiner, Германия) и культивировали по описанной выше методике для МСК из КМ.

Индукция остеогенной и адипогенной дифференцировок МСК *in vitro*. МСК в концентрации $0.2 \cdot 10^4$ кл./см² высевали в культуральные флаконы площадью 25 см² (Greiner, Германия) для выделения тотальной РНК и в 12-луночные платы (Greiner, Германия)

Праймеры для ПЦР

Название гена	Идентификационный номер	Нуклеотидная последовательность	Размер продукта, н. п.
<i>GAPDH</i>	NM_017008	5' tacaacctccttcagctcc 3' 5' ggatcttcagaggtagtctgtc 3'	378
<i>THY-1</i>	NM_012673	5' gaaccagtcacagcatcac 3' 5' gggcccaaccagtcacagag 3'	496
<i>NT5E</i>	NM_021576	5' ccgggggcccactgacacctca 3' 5' ggcctggaccacgggaacctt 3'	401
<i>ENG</i>	NM_001010968	5' tccagctgcgcatgaaagtgaca 3' 5' gagcagggccccaatgaggaagg 3'	553
<i>CD19</i>	XM_344961	5' tggttctatggcggcttttctct 3' 5' acggggtcatcctcagggttctca 3'	415
<i>ITGAM</i>	NM_012711	5' gggggcaaggatcacaatggac 3' 5' ttaaggcgcaggatgatgggactc 3'	473
<i>RUNX2</i>	XM_346016	5' ccgcacgacaaccgacctac 3' 5' cgctccggcctacaatctc 3'	289
<i>ALPL</i>	NM_013059	5' tggcctccggatcctgacaaga 3' 5' cgccgtgaagcaggtgagccatag 3'	477
<i>COL1A1</i>	NM_053304	5' cgttactaccggccgatgatgc 3' 5' cttctccttggggttgggctgat 3'	324
<i>SPP1</i>	NM_012881	5' tcccgggaaagtggctgagt 3' 5' tgtggggcgattggagtc 3'	362
<i>BGLAP</i>	NM_013414	5' agactccggcgctacctcaa 3' 5' cagctgtgccctacacttcc 3'	273
<i>PPARD</i>	NM_013141	5' ttcatgcccacatcattctgtg 3' 5' tctggccgtgtctggagtgtgt 3'	405
<i>PPARG</i>	NM_013124	5' cgtccccgcttattattctga 3' 5' cctcgccctggccttggctc 3'	455
<i>FABP4</i>	NM_053365	5' ttgtggggacctggaaactcg 3' 5' tccaccaccagctgtcaccac 3'	373
<i>LEP</i>	NM_013076	5' ccggttctgtggcttggctc 3' 5' tatctgcagcagcttttgggaagg 3'	271

для иммуноцитохимического и гистохимического анализов. Для индукции остеогенеза МСК 3-го пассажа культивировали в стандартной ростовой среде с добавлением 10^{-8} М дексаметазона, 50 мкг/мл фосфата аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицерофосфата (стандартная остеогенная/индукционная среда) в течение 16—21 сут со сменной среды через 3—4 сут. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих маркеры остеогенной дифференцировки, оценивали на 2, 5, 7, 12, 16 и 21-е сут культивирования МСК в контрольной (без добавления индукторов остеогенеза) и остеогенной средах. Для визуализации минеральных отложений во внеклеточном матриксе клетки промывали PBS, фиксировали ледяным 70%-ным этанолом в течение 1 ч, промывали дистиллированной водой и окрашивали раствором ализаринового красного S (рН 4.1) в течение 10 мин, после чего дважды отмывали PBS и докрасивали ядра гематоксилином. Активность щелочной фосфатазы оценивали с использованием набора «Alkaline Phosphatase» согласно протоколу фирмы-производителя.

Для индукции адипогенеза МСК 3-го пассажа культивировали в стандартной ростовой среде с добавлением 10^{-6} М дексаметазона, 0.5 мМ индометацина и 100 нг/мл инсулина (стандартная адипогенная/индукционная среда) в течение 10—16 сут. Среду меняли через 3—4 сут. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих маркеры адипогенной дифференцировки, оценивали на 3, 5, 7, 10-е сут и на 2, 7, 12, 16-е сут культивирования в контрольной (без добавления индукторов адипогенеза) и адипогенной средах МСК из КМ и ЗП соответственно. Появление клеток с жировыми включениями контролировали в течение всего срока культивирования с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Olympus IX51 (Япония). Мультилокулярные адипоциты появлялись уже на 3—4-е сут культивирования в культуре МСК из КМ и на 12—13-е сут из ЗП. Для визуализации жировых включений клетки окрашивали раствором жирового красного О или растворами судана III и IV (Пирс, 1962). Гистохимические реакции анализировали с помощью микроскопа Olympus АН-3 (Япония). Опыты по остеогенной и адипогенной дифференцировкам повторяли 3—5 раз.

Иммуноцитохимические исследования. Иммунофенотипическую характеристику МСК проводили на 0—3-м пассажах с использованием антител к CD90 (1 : 80), CD73 (1 : 750), CD45 (1 : 150), CD34 (1 : 20) и CD144 (1 : 500). В качестве положительного контроля для фенотипических маркеров кровяных клеток CD45 и CD34 использовали отпечатки селезенки половозрелых крыс, для маркера эндотелиальных клеток CD144 — криостатные срезы глаза эмбриона крысы первого триместра беременности. Остеогенные потенциалы МСК изучали с ис-

пользованием набора «Alkaline Phosphatase» согласно протоколу фирмы-производителя. Для индукции адипогенеза МСК 3-го пассажа культивировали в стандартной ростовой среде с добавлением 10^{-6} М дексаметазона, 0.5 мМ индометацина и 100 нг/мл инсулина (стандартная адипогенная/индукционная среда) в течение 10—16 сут. Среду меняли через 3—4 сут. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих маркеры адипогенной дифференцировки, оценивали на 3, 5, 7, 10-е сут и на 2, 7, 12, 16-е сут культивирования в контрольной (без добавления индукторов адипогенеза) и адипогенной средах МСК из КМ и ЗП соответственно. Появление клеток с жировыми включениями контролировали в течение всего срока культивирования с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Olympus IX51 (Япония). Мультилокулярные адипоциты появлялись уже на 3—4-е сут культивирования в культуре МСК из КМ и на 12—13-е сут из ЗП. Для визуализации жировых включений клетки окрашивали раствором жирового красного О или растворами судана III и IV (Пирс, 1962). Гистохимические реакции анализировали с помощью микроскопа Olympus АН-3 (Япония). Опыты по остеогенной и адипогенной дифференцировкам повторяли 3—5 раз.

пользованием антител к белкам внеклеточного матрикса кости коллагену I типа (1 : 4000), остеокальцину (1 : 10), костному сиалопротеину (1 : 3500) и факторам транскрипции Osterix (1 : 80) и Runx2 (1 : 600). При изучении адипогенных потенциалов МСК использовали антитела к ядерному рецептору PPAR δ (1 : 125) и маркеру функционально зрелых адипоцитов ALBP (1 : 100).

МСК помещали в 12-луночные платы в концентрациях от $0.5 \cdot 10^3$ до $0.2 \cdot 10^4$ кл./см². Клетки промывали PBS и фиксировали 3.7%-ным формалином (при инкубации клеток с антителами к CD90) или ледяным ацетоном (при инкубации клеток с антителами к коллагену I типа) в течение 10 мин. После фиксации клетки промывали PBS и последовательно инкубировали в 0.25%-ном растворе Тритона X-100, приготовленном на трис-солевом буфере (TBS) с добавлением 0.1 % Твин 20 в течение 30 мин, и в блокирующем растворе (3%-ный раствор сывороточного альбумина коровы, приготовленный на TBS с 0.1 % Твина 20) в течение 30 мин при 20 °С. Клетки промывали PBS и инкубировали с первыми антителами в блокирующем растворе в течение 40 мин при 37 °С. После инкубации с первыми антителами клетки промывали PBS 4 раза по 5 мин и инкубировали в блокирующем растворе со вторыми антителами, меченными флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 или 568, с разведением 1 : 1000 30 мин при 37 °С. После инкубации со вторыми антителами клетки промывали PBS и заключали под покровные стекла в глицерин с DAPI. Специфичность вторых антител подтверждали с помощью контролей, в которых реакцию проводили в отсутствие первых антител. Отсутствие флуоресценции свидетельствовало о специфичности реакции. Реакцию анализировали с помощью микроскопа Leica DM RXA2 (Германия). Анализ изображения проводили с помощью компьютерной программы Image J.

Выделение РНК и синтез кДНК. Выделение тотальной РНК из культуры МСК печени зародыша и КМ половозрелых крыс осуществляли с помощью реактива TRI[®] Reagent. Синтез кДНК проводили на тотальной РНК (5 мкг) с помощью обратной транскриптазы M-MLV и олиго(dT)₁₅-праймеров, предварительно обработав тотальную РНК ДНКазой «Turbo» для исключения контаминации библиотеки кДНК геномной ДНК.

Конструирование праймеров. Анализ антигенного профиля проводили с использованием специфических праймеров к генам CD90 (*THY-1*), CD73 (*NT5E*), CD105 (*ENG*), CD11b (*ITGAM*), CD19 (*CD19*); анализ остеогенных потенциалов — к генам остеокальцина (*BGLAP*), щелочной фосфатазы (*ALPL*), коллагена типа I (*COL1A1*), остеоопонтина (*SPP1*), фактора транскрипции Runx2 (*RUNX2*); анализ адипогенных потенциалов — к генам лептина (*LEP*), ALBP (*FABP4*), ядерных рецепторов PPAR δ (*PPARD*) и PPAR γ (*PPARG*). При конструировании праймеров использовали данные о структуре исследуемых генов, полученные из международной базы данных NCBI (США) и компьютерной программы DNASTar (США) (см. таблицу). Праймеры конструировали с учетом экзон-интронной композиции исследуемого гена.

Нормировка библиотек кДНК. При количественной оценке уровня экспрессии исследуемых генов кДНК была предварительно нормирована по *GAPDH* (см. таблицу).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР со специфическими праймерами проводили на матрице кДНК с использованием ColoredTaq-полимеразы на амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Условия

амплификации варьировали в зависимости от нуклеотидной последовательности праймеров (см. таблицу). ПЦР-продукты разделяли электрофоретически в 1%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Оценку интенсивности свечения ПЦР продуктов проводили на анализаторе гелей (BIO-RAD, США) с помощью программы для анализа электрофоретического изображения QuantityOne (BIO-RAD, США).

Статистическая обработка результатов исследования. Подсчет среднеквадратической (стандартной) ошибки среднего числа «костных узелков» на 1 мм² площади культурального флакона основан на экспресс-методе статистической обработки с использованием таблиц Стрелкова (1999).

Результаты

Антигенный профиль МСК. С использованием иммуноцитохимии и ПЦР-анализа исследован антигенный профиль МСК из КМ и ЗП. В обеих культурах не выявлено экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45, маркера ранних кроветворных предшественников CD34, антигена В-лимфоцитов CD19 и маркера эндотелиальных клеток CD144 начиная с 1-го пассажа. Присутствие крайне незначительного количества CD144⁺-клеток наблюдалось только в первичной культуре (0-й пассаж) МСК из ЗП и не обнаружено в первичной культуре МСК из КМ при иммуноцитохимическом окрашивании. С помощью ПЦР-анализа в культурах МСК из КМ на 1-м пассаже выявлена мРНК гена CD11b (*ITGAM*), маркера моноцитов/макрофагов и гранулоцитов, однако экспрессия этого гена не обнаруживалась при дальнейшем культивировании. В клеточных культурах из ЗП экспрессия *ITGAM* изначально была крайне низкой. мРНК гена *CD19* не обнаружена в обеих популяциях клеток (рис. 1, б). Иммунофенотип, характеризующий клетки как МСК, оценивали по экспрессии CD90 и CD73. На начальных этапах культивирования костномозговых МСК (0—3-й пассажи) практически все клетки несли на своей поверхности CD90 и CD73 (рис. 2, а, б). МСК из ЗП также имели положительную реакцию на CD90 (рис. 2, в), но различались гетерогенностью по экспрессии CD73 (рис. 2, з). С использованием специфических праймеров выявлена экспрессия генов CD105 (*ENG*), CD90 (*THY-1*), CD73 (*NT5E*) в обеих популяциях МСК (рис. 1, а).

Остеогенные потенциалы МСК. В культуре МСК из КМ остеогенез имел очаговый характер. Первые презумптивные очаги остеогенеза — участки отложения внеклеточного матрикса — появлялись уже на 10—12-е сут культивирования клеток в остеогенной среде (опытная культура/опыт), что подтверждалось иммуноцитохимическим использованием антител к коллагену типа I и костному сиалопротеину. Эти участки также слабо окрашивались ализариновым красным S, что свидетельствовало о начале их минерализации. На 14—16-е сут эксперимента уже полностью сформированы «костные узелки» — скопления внеклеточного минерализованного матрикса и полигональных клеток, похожих на остеообласты (рис. 3). Иммуноцитохимическое мечение таких скоплений антителами к остеокальцину дало положительный результат (рис. 3, д, д'). Среднее число «костных узелков» составило 0.72 ± 0.17 на 1 мм² площади культурального флакона. При этом на всех сроках культивирования МСК из КМ в стандартной ростовой среде (контрольная куль-

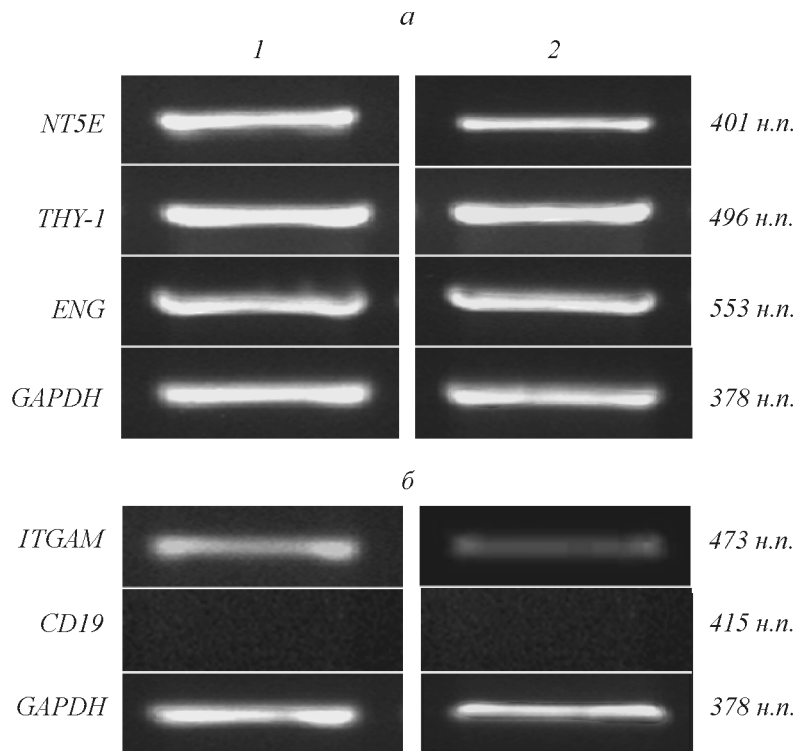


Рис. 1. Данные ПЦР-анализа по экспрессии генов позитивных (а) и негативных (б) маркеров МСК на 1-м пассаже.

а — сравнительная оценка экспрессии генов *NT5E*, *THY-1*, *ENG* в МСК из костного мозга (1) и зародышей печени (2) не выявила существенных различий; б — сравнительная оценка экспрессии генов *ITGAM* и *CD19* в МСК из костного мозга (1) и зародышевой печени (2). Справа обозначен молекулярный вес фрагментов ПЦР-реакции в нуклеотидных парах (н. п.).

тура/контроль) экспрессия вышеперечисленных белков не выявлена.

Интенсивность реакции на щелочную фосфатазу оценивали на 3, 9 и 16-е сут эксперимента. По мере увеличения сроков культивирования МСК в индукционной среде происходило значительное усиление активности этого фермента, которая достигала максимальных значений в пределах «костных узелков» на 16-е сут эксперимента, тогда как в контрольной культуре уровень экспрессии щелочной фосфатазы оставался приблизительно одинаковым в течение всего эксперимента (рис. 4, а).

Анализ экспрессии фактора транскрипции *Osterix* в культуре МСК из КМ выявил его ядерную локализацию в клетках в пределах очагов остеогенеза, где его количество было максимальным. Значительное усиление экспрессии фактора *Osterix* наблюдалось довольно рано, на 10-е сут, когда обособления «костных узелков» еще не происходило (рис. 3, а, а'). Необходимо отметить, что в контроле также обнаружено положительное окрашивание клеток на этот фактор транскрипции, однако уровень сигнала был настолько низким, что можно говорить лишь о его следовых количествах в недифференцированных МСК.

В сравнимых экспериментальных условиях в культуре МСК из ЗП наблюдались морфогенетические преобразования, отчасти напоминающие таковые в остеогенной культуре МСК из КМ. Уже к 10-м сут инкубации в остеогенной среде клетки формировали скопления, сходные с «костными узелками». К 14—16-м сут в таких скоплениях выявлялись отложения межклеточного вещества, представленные коллагеном типа I (рис. 3, е, е') и костным сигналопротеином (рис. 3, з, з'), однако практически полностью отсутствовала их минерализация (рис. 4, з). Следует обратить внимание на то, что клетки в составе

скоплений сохраняли веретеновидную форму, тем самым отличаясь от типичных остеобластов. Среднее число участков с отложениями кальция было ничтожно мало и составило $2 \cdot 10^{-4} \pm 0.28$ на 1 мм^2 площади культурального флакона. В клеточных скоплениях, напоминающих «костные узелки», экспрессия фактора транскрипции *Osterix* и остеокальцина также отсутствовала (рис. 3, б, б'). В начале эксперимента лишь единичные МСК давали положительную реакцию на щелочную фосфатазу, однако к 16-м сут культивирования в остеогенной среде численность клеток, синтезирующих этот фермент, возрастала (рис. 4, б). Тем не менее в культуре МСК из ЗП число клеток, положительно окрашенных на щелочную фосфатазу, а также интенсивность реакции были заметно ниже по сравнению с таковыми в культуре МСК из КМ.

Во всех исследованных культурах МСК из КМ экспрессия структурных генов *BGLAP*, *ALPL*, *SPP1* и *COL1A1* достигала пиковых значений к поздним срокам культивирования МСК в остеогенной среде (рис. 5, а). Уровень экспрессии *RUNX2* в опытных культурах оставался высоким начиная с 5-х сут культивирования вплоть до терминальных этапов дифференцировки МСК. Экспрессия этого гена выявлялась и в контрольных культурах, но была существенно ниже и имела нестабильный характер (рис. 5, а).

Анализ профилей экспрессии *BGLAP* и *ALPL* в МСК из ЗП на всех сроках инкубации клеток в остеогенной среде выявил крайне слабую экспрессию указанных генов. В контрольных культурах экспрессия *ALPL* не обнаружена, а количество мРНК *BGLAP* сравнимо с таковым в опытной культуре, как показано на рис. 5, а. На протяжении всего культивирования печеночных МСК выявлена значительная экспрессия *COL1A1* как в контроле, так и в опыте. На всех сроках культивирования в опытной куль-

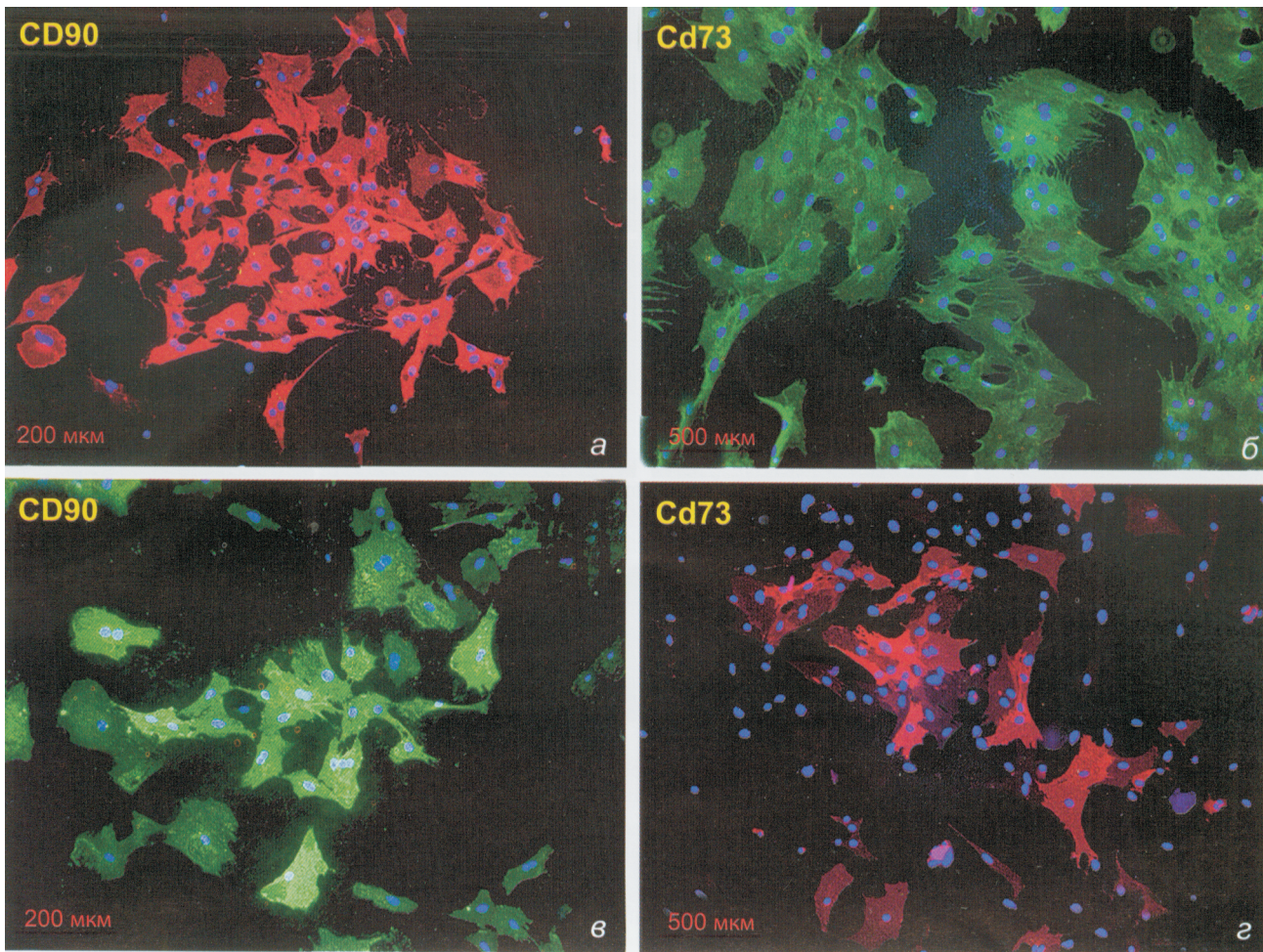


Рис. 2. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии антигенов CD 90 и CD73 на поверхности культивируемых МСК из костного мозга и зародышевой печени (3-й пассаж).

a, б — выявление CD90 и CD73 в культуре МСК из костного мозга; *в, г* — выявление CD90 и CD73 в культуре МСК из зародышевой печени.

туре детектирована мРНК *SPP1*, причем вплоть до 5-х сут эксперимента уровень экспрессии этого гена мало отличался от наблюдаемого в контроле и становился несколько выше начиная с 8-х сут (рис. 5, *a*). Динамика экспрессии *RUNX2* в опыте не отличалась от таковой в контроле, и лишь на 11—16-е сут инкубации клеток в остеогенной среде происходило некоторое усиление экспрессии этого гена.

Адипогенные потенции МСК. Гистохимическое окрашивание жировым красным О и суданом III и IV жировых включений в культурах МСК из КМ и ЗП проводили на 10—16-е сут инкубации клеток в адипогенной среде, когда были полностью сформированы группы дифференцированных адипоцитов. Адипогенная дифференцировка МСК из КМ была выражена сильнее, что заключалось в относительно высокой численности адипоцитов, равномерно распределенных по площади культурального флакона, и более раннем появлении первых жировых клеток (3-и сут эксперимента) (рис. 4, *д*). Первые группы дифференцированных адипоцитов в популяции МСК из ЗП появлялись позже, на 14—16-е сут инкубации клеток в адипогенной среде. Эти группы были обособлены от остальных клеток, сохраняющих фибробластоподобную морфологию. Последние также обнаруживались и среди адипоцитов внутри группы (рис. 4, *е*).

Иммунофлуоресцентный анализ выявил ядерную локализацию фактора транскрипции PPAR δ как в контроль-

ных, так и в опытных культурах МСК из КМ (рис. 6, *a, б*). В контроле уровень экспрессии фактора PPAR δ был несколько ниже (рис. 6, *a, a''*). В опытной культуре МСК из ЗП лишь в отдельных клетках уровень иммунофлуоресцентного сигнала при окрашивании антителами к фактору транскрипции PPAR δ был сопоставим с таковым в МСК из КМ (рис. 6, *г, г''*) и практически отсутствовал в клетках контрольной культуры (рис. 6, *в, в''*). С помощью антител к маркеру зрелых адипоцитов ALBP выявлено, что на поздних этапах культивирования МСК из КМ в адипогенной среде происходит заметное увеличение содержания этого белка в цитоплазме клеток. Следует отметить, что в контроле (рис. 7, *a, a''*) и на ранних сроках инкубации МСК из КМ в индукционной среде белок ALBP преимущественно локализовался в ядре. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркера зрелых адипоцитов ALBP в опытной культуре МСК из ЗП выявил, что лишь в отдельных клетках локализация этого белка в равной степени приходилась на ядро и цитоплазму, тогда как в остальных клетках белок ALBP преимущественно располагался в ядрах (рис. 7, *г, г''*). В клетках контрольной культуры МСК из ЗП содержание маркера ALBP было существенно ниже, чем в клетках опытной, при этом белок располагался только в ядрах (рис. 7, *в, в''*).

Изучение экспрессии *PPARG* выявило присутствие мРНК этого гена как в контрольной, так и в опытной

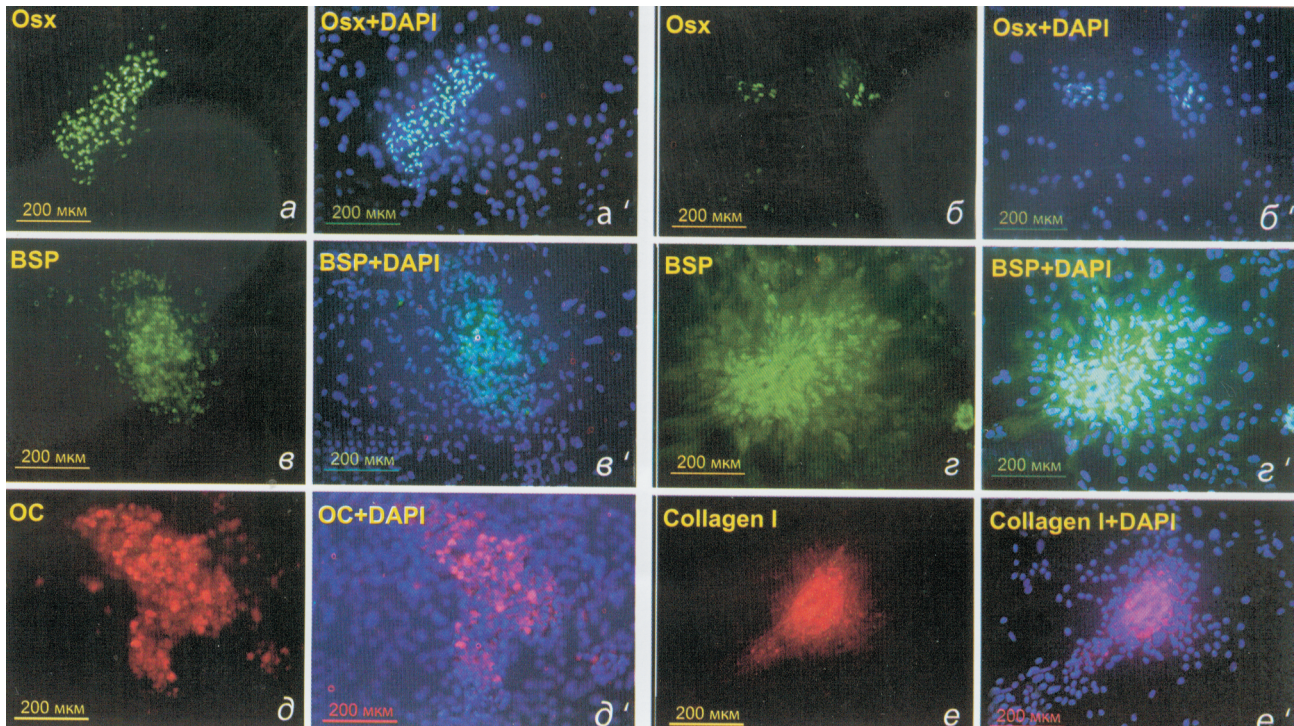


Рис. 3. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки МСК из костного мозга и зародышевой печени на 16-е сут культивирования в остеогенной среде (3-й пассаж).

a, a', б, б' — выявление транскрипционного фактора Osterix (Osx) в пределах «костных узелков» в культуре МСК из костного мозга (*a, a'*) и в отдельных клетках в культуре МСК из зародышевой печени (*б, б'*); *в, в', г, г'* — выявление костного сиалопротеина (BSP) в очагах остеогенеза в культуре МСК из костного мозга (*в, в'*) и скопления клеток, напоминающих «костные узелки», в культуре МСК из зародышевой печени (*г, г'*); *д, д'* — выявление остеокальцина в клетках, морфологически сходных с остеобластами, в культуре МСК из костного мозга; *е, е'* — отложения коллагена I типа в культуре МСК из зародышевой печени. *a'—e'* — совмещение изображений результата иммуномечения клеток соответствующими антителами и их ядер, окрашенных DAPI.

культурах костномозговых МСК на протяжении всего срока культивирования. Однако под влиянием адипогенных индукторов наблюдалось усиление экспрессии *PPARG* на поздних сроках эксперимента. В аналогичных экспериментальных условиях печеночные МСК экспрессировали данный ген гораздо слабее как в контроле, так и в опыте. Максимальный уровень экспрессии генов *PPARD*, *LEP* и *FABP4* приходился на поздние сроки культивирования костномозговых МСК в индукционной среде, что соответствует 7—10-м сут эксперимента. Также отмечено, что уровень экспрессии гена *LEP* гораздо ниже такового гена *FABP4*. В контрольных культурах количество мРНК генов *PPARD*, *LEP* и *FABP4* было невелико или вовсе не обнаруживалось (рис. 5, б). Анализ профиля экспрессии генов *PPARG*, *PPARD* и *FABP4* на поздних сроках культивирования печеночных МСК выявил присутствие мРНК этих генов в крайне незначительном количестве как в контрольных, так и в опытных культурах, за исключением гена *PPARD*, матрица которого обнаружена только в опыте. Экспрессия гена *LEP* в культуре МСК из ЗП не выявлена (рис. 5, б).

Обсуждение

В результате проведенного иммуноцитохимического и молекулярно-генетического анализа антигенного профиля МСК на разных этапах культивирования было показано, что клеточные популяции из обоих источников характеризуются сходным фенотипом, а именно экспрес-

сией поверхностных антигенов CD90, CD73 и CD105, что с определенностью доказывает их принадлежность к типичным МСК (Dominici et al., 2006; Delorme, Charbord, 2007). В то же время в культурах МСК из КМ и ЗП начиная со 2-го пассажа не обнаружена экспрессия антигенов CD34, CD45, CD11b, CD19 и CD144, что свидетельствует об отсутствии примесей кроветворных, лимфоидных и эндотелиальных клеток. CD144⁺-клетки выявлены на ранних этапах культивирования МСК из КМ и ЗП и полностью исчезли при их последующем пассировании. Впервые нами обнаружены существенные различия в уровне экспрессии антигена CD73 в пределах популяции МСК из ЗП. Вероятно, это связано с неодинаковым дифференцировочным статусом клеток. Нами также не исключено присутствие других линий дифференцировок (Fukada et al., 2002; Machaj et al., 2005). Кроме того, среди стромальных клеток ЗП в тот период, когда она выполняет функцию временного кроветворного органа, идентифицирована особая популяция клеток, несущая на своей поверхности маркеры как эпителия, так и мезенхимы. Авторы, описавшие данную популяцию, предложили для нее термин «эпителио-мезенхимные клетки» (Chagraoui et al., 2003). Возможно, аналогичная популяция присутствует в наших экспериментах по культивированию клеток ЗП и вносит свой вклад в фенотипическую характеристику МСК, в частности в экспрессию CD73. Тем не менее доминирующей популяцией в этой культуре остаются МСК.

Сравнительный анализ остеогенных потенциалов МСК из обоих источников в сходных экспериментальных усло-

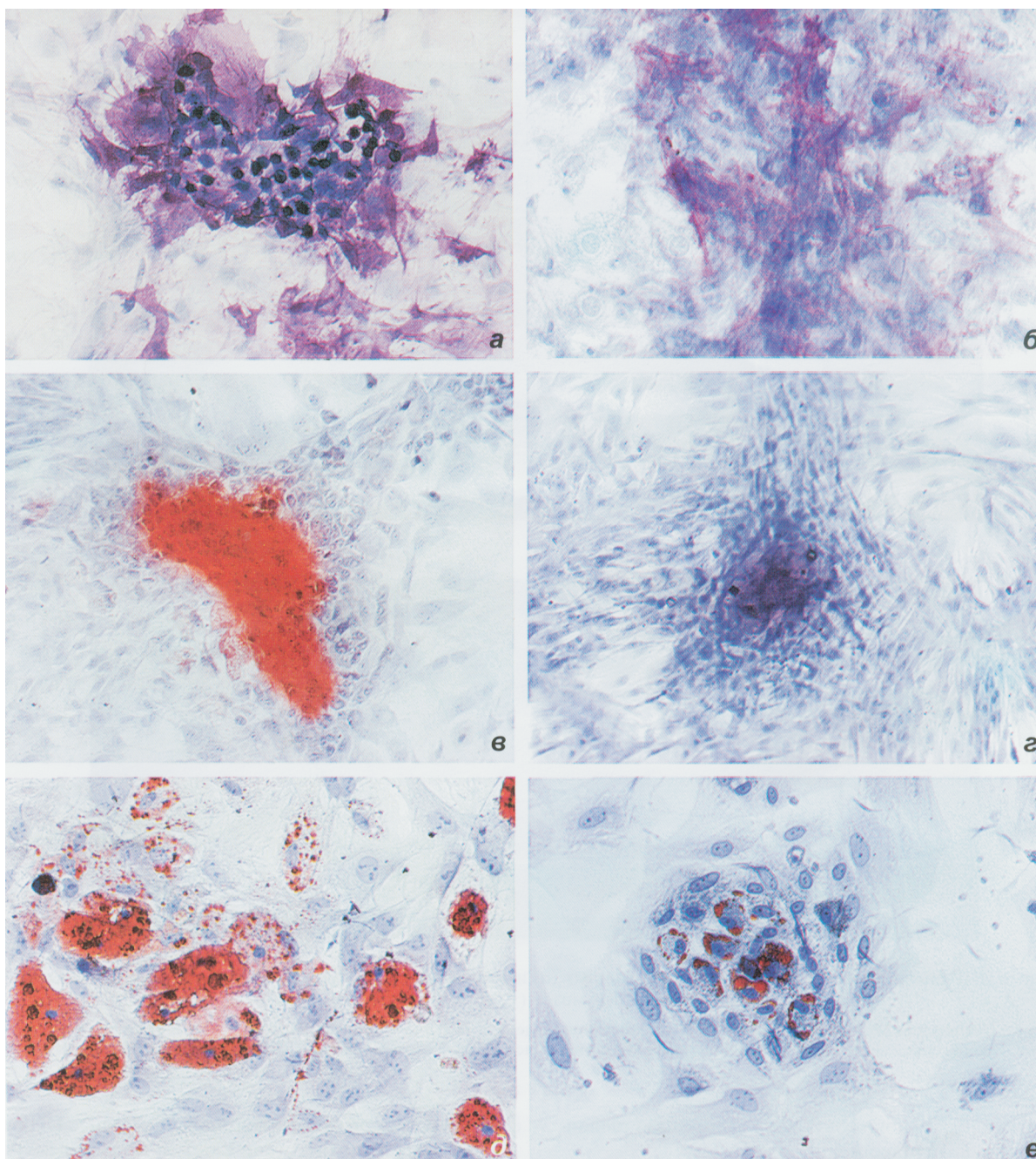


Рис. 4. Гистохимическая характеристика остеогенных и адипогенных потенциалов МСК из костного мозга и зародышевой печени на поздних сроках культивирования клеток в индукционных средах.

a, б — активность щелочной фосфатазы в МСК из костного мозга (*a*) и зародышевой печени (*б*) на 16-е сут культивирования в остеогенной среде; увел.: об. 10×, ок. 10×. *в, г* — выявление ализариновым красным S участков скопления соединений кальция в культуре МСК из костного мозга (*в*) и зародышевой печени (*г*); увел.: об. 10×, ок. 10×. *д, е* — выявление с помощью судана III и IV липидных включений в адипоцитах, производных МСК из костного мозга (*д*) и зародышевой печени (*е*), в обеих популяциях обнаружены только мультилокулярные адипоциты; увел.: об. 20×, ок. 10×. Во всех случаях ядра окрашены гематоксилином.

виях показал крайне низкую способность к остеогенезу МСК из ЗП в отличие от выраженных остеогенных потенциалов МСК из КМ половозрелых животных. Во всех экспериментах по остеогенной дифференцировке костномозговых МСК экспрессия основных маркерных белков костной ткани — остеокальцина, костного сиалопротеина и коллагена I типа — была ограничена «костными узелками», что характеризует их как центральные очаги остеогенеза *in vitro*. С помощью фазово-контрастной микро-

скопии было выявлено, что клетки в этих участках приобретали полигональную форму, а ядра смещались к периферии, т. е. становились похожими на остеобласты. С увеличением срока культивирования МСК из КМ в остеогенной среде также возрастала активность щелочной фосфатазы, что связано с участием этого фермента в формировании кристаллов гидроксиапатита во внеклеточном матриксе (Stevens, Lowe, 1993). Следует обратить внимание на то, что в культуре МСК из ЗП при аналогичных

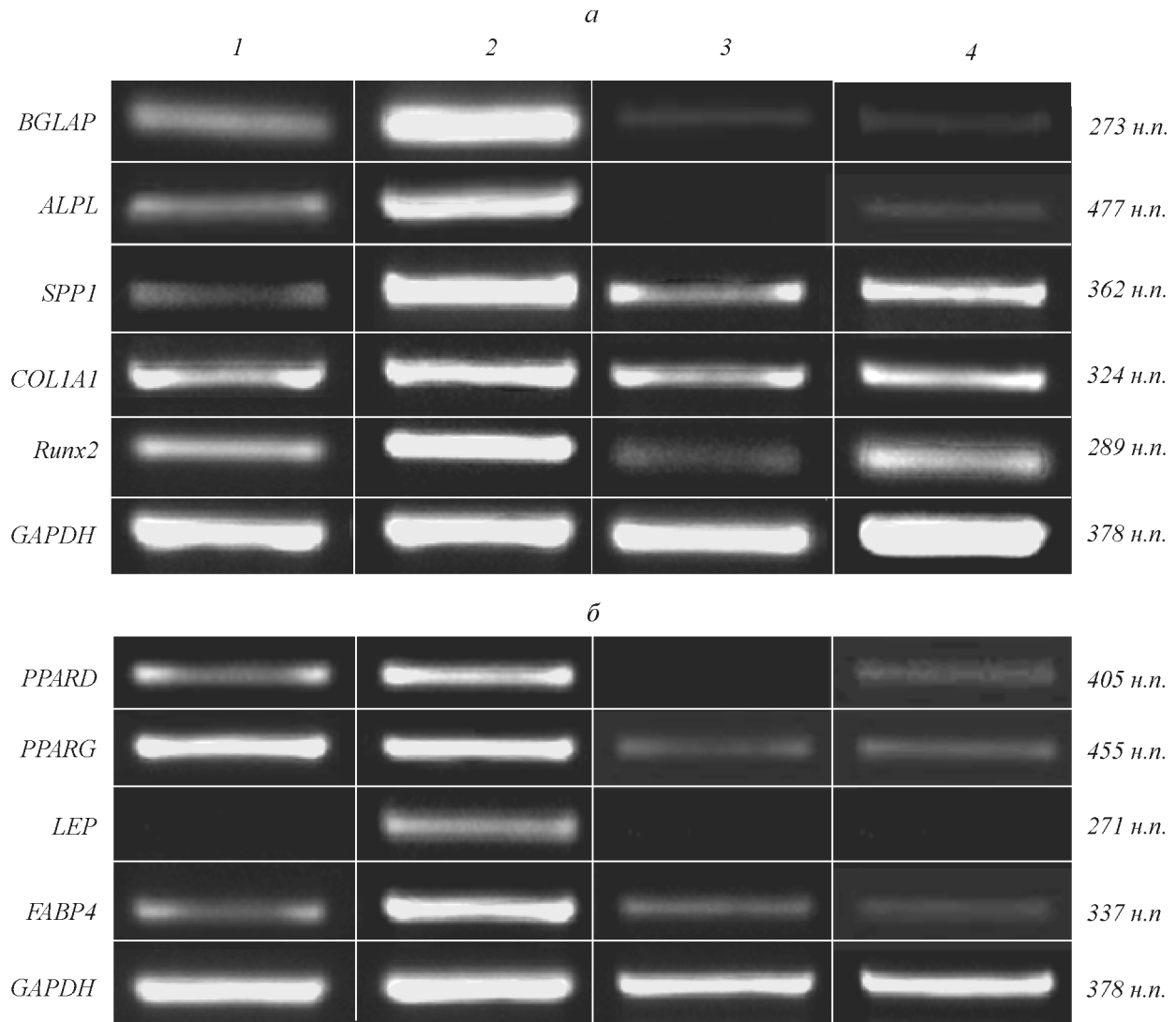


Рис. 5. Данные ПЦР-анализа по экспрессии генов остеогенных (а) и адипогенных (б) маркеров в контрольных (1, 3) и опытных (2, 4) культурах МСК из костного мозга (1, 2) и зародышевой печени (3, 4).

а — 16-е сут культивирования МСК из обоих источников в остеогенной среде; б — 10-е и 16-е сут культивирования МСК из костного мозга и зародышевой печени в адипогенной среде соответственно. Справа обозначен молекулярный вес фрагментов ПЦР-реакции в нуклеотидных парах (н. п.).

экспериментальных условиях уровень экспрессии щелочной фосфатазы был существенно ниже.

Завершение остеогенной дифференцировки формированием зрелых остеобластов и минерализацией внеклеточного матрикса также подтверждается максимальной экспрессией генов *BGLAP*, *ALPL*, *SPP1* и *COL1A1* на поздних сроках культивирования МСК в остеогенной среде. Начиная с самых ранних этапов остеогенеза МСК из КМ высокая степень экспрессии гена *RUNX2* свидетельствует о его исключительно важной роли как при запуске молекулярной программы остеогенной дифференцировки, так и на ее завершающих этапах. В культуре МСК из ЗП подобной картины не наблюдалось. В процессе культивирования в остеогенной среде часть клеток формировала скопления с отложением коллагена типа I и костного сиалопротеина, однако отсутствие минерализации внеклеточного матрикса и сохранение клетками фибробластоподобной морфологии в пределах таких скоплений указывают на неспособность печеночных МСК в заданных условиях культивирования завершить терминальную

фазу остеогенной дифференцировки. Данные ПЦР-анализа находятся в соответствии с результатами иммуноцитохимических и гистохимических исследований и однозначно свидетельствуют о крайне незначительном количестве мРНК генов остеокальцина *BGLAP* и щелочной фосфатазы *ALPL* на финальных этапах культивирования печеночных МСК в остеогенной среде. Вместе с тем эти же данные свидетельствуют о наличии мРНК гена остеоопонтина *SPP1* на всех сроках культивирования МСК из ЗП. Необходимо пояснить, что остеокальцин и остеоопонтин являются высокоспецифическими кальцийсвязывающими белками костного внеклеточного матрикса. Однако в отличие от маркера функционально зрелых остеобластов остеокальцина экспрессия остеоопонтина в основном осуществляется незрелыми остеобластами (Liu et al., 2001). Кроме того, остеоопонтин рассматривается как фенотипический маркер клеток мезенхимного происхождения (Charbord et al., 2002; Chagraoui et al., 2003). Поэтому увеличение количества мРНК кодирующего остеоопонтин гена *SPP1* в культуре МСК из ЗП не является

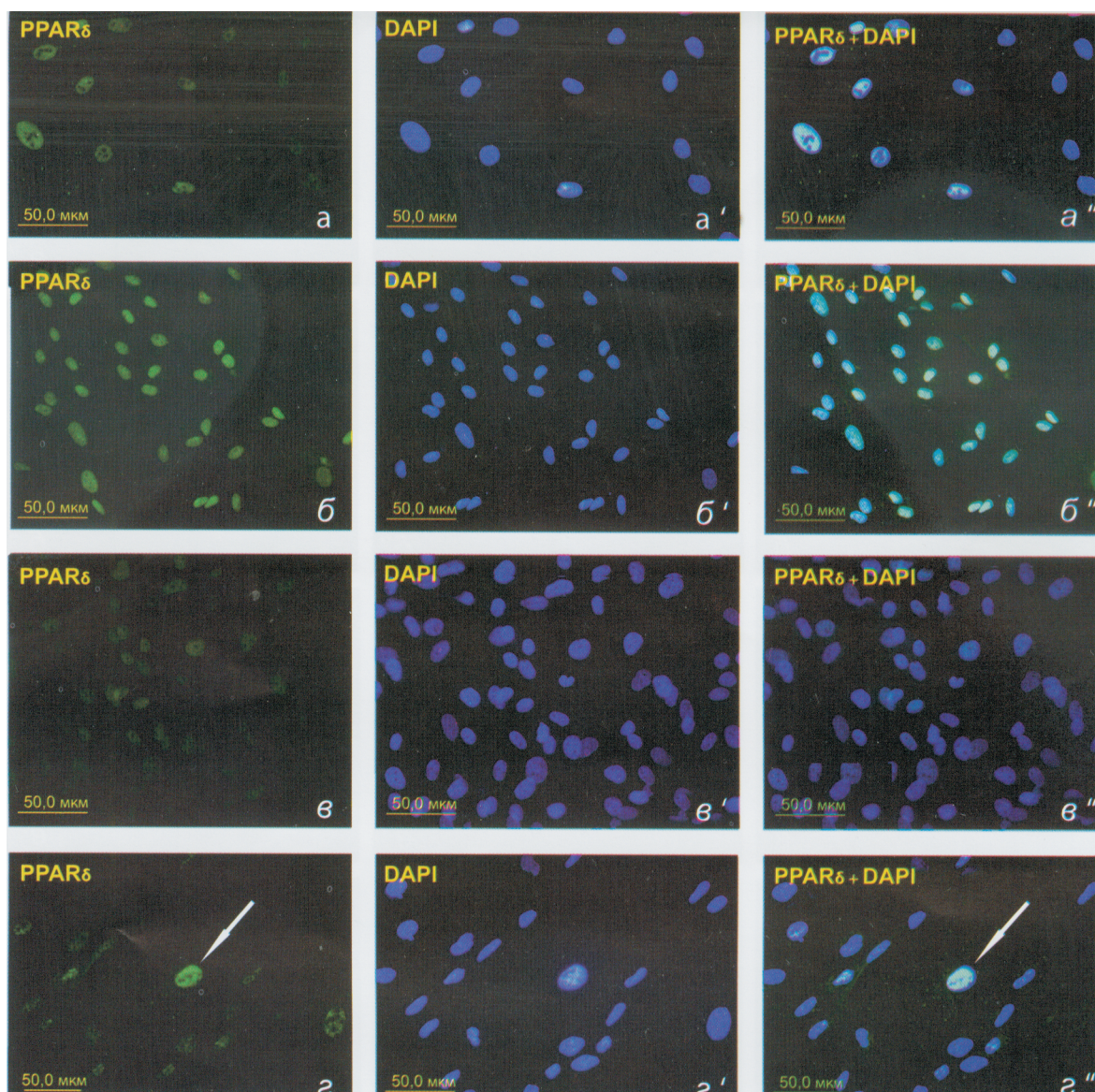


Рис. 6. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии фактора транскрипции PPAR δ МСК на 3-м пассаже.

a — a'' — МСК из костного мозга, культивируемые в стандартной ростовой среде (контроль); $б$ — $б''$ — МСК из костного мозга, культивируемые в адипогенной среде (опыт); $в$ — $в''$ — МСК из зародышевой печени, культивируемые в стандартной ростовой среде (контроль); $г$ — $г''$ — МСК из зародышевой печени, культивируемые в адипогенной среде (опыт). a' , $б'$, $в'$, $г'$ — ядра клеток, окрашенные с использованием DAPI; a'' , $б''$, $в''$, $г''$ — совмещение изображений результата иммуномечения клеток соответствующими антителами и их ядер, окрашенных DAPI. Стрелкой указана единичная клетка с высоким уровнем экспрессии белка PPAR δ .

достаточным признаком реализации программы остеогенной дифференцировки.

Особого внимания заслуживает экспрессия фактора транскрипции Osterix, поскольку наряду с фактором транскрипции Runx2 он является ключевым регулятором остеогенной дифференцировки (Nakashima et al., 2002). Нами впервые проанализирован ряд особенностей временного и пространственного паттерна распределения этого фактора в МСК из КМ *in vitro*. Как показали наши данные, экспрессия фактора Osterix топографически четко связана с формированием презумптивных «костных узелков», где она достигает своих максимальных значений. Эти наблюдения в полной мере согласуются с экспериментами *in vivo* о ведущей роли этого транскрипционного фактора в контроле над терминальными этапами остеогенеза (Lee et al., 2003). Показано, что у мышей с

нокаутом по гену *Osterix* отсутствует экспрессия остеокальцина — маркера поздних этапов дифференцировки остеобластов, и наблюдается блокирование дифференцировки преостеобластов в зрелые клетки (Nakashima et al., 2002). Напротив, сравнимая экспрессия этого фактора в культуре МСК из ЗП наблюдалась лишь в отдельных клетках (рис. 3, б) и полностью отсутствовала в их скоплениях, отдаленно напоминающих «костные узелки», что в очередной раз доказывает крайне слабую способность этих клеток к остеогенезу *in vitro*. Тем не менее присутствие в ЗП клеток, способных к остеогенной дифференцировке *in vivo*, можно предполагать на основании результатов экспериментов по ее трансплантации под капсулу почки мыши, что приводило к образованию в трансплантате костной ткани с последующим формированием кроветворящего костномозгового органа (Старо-

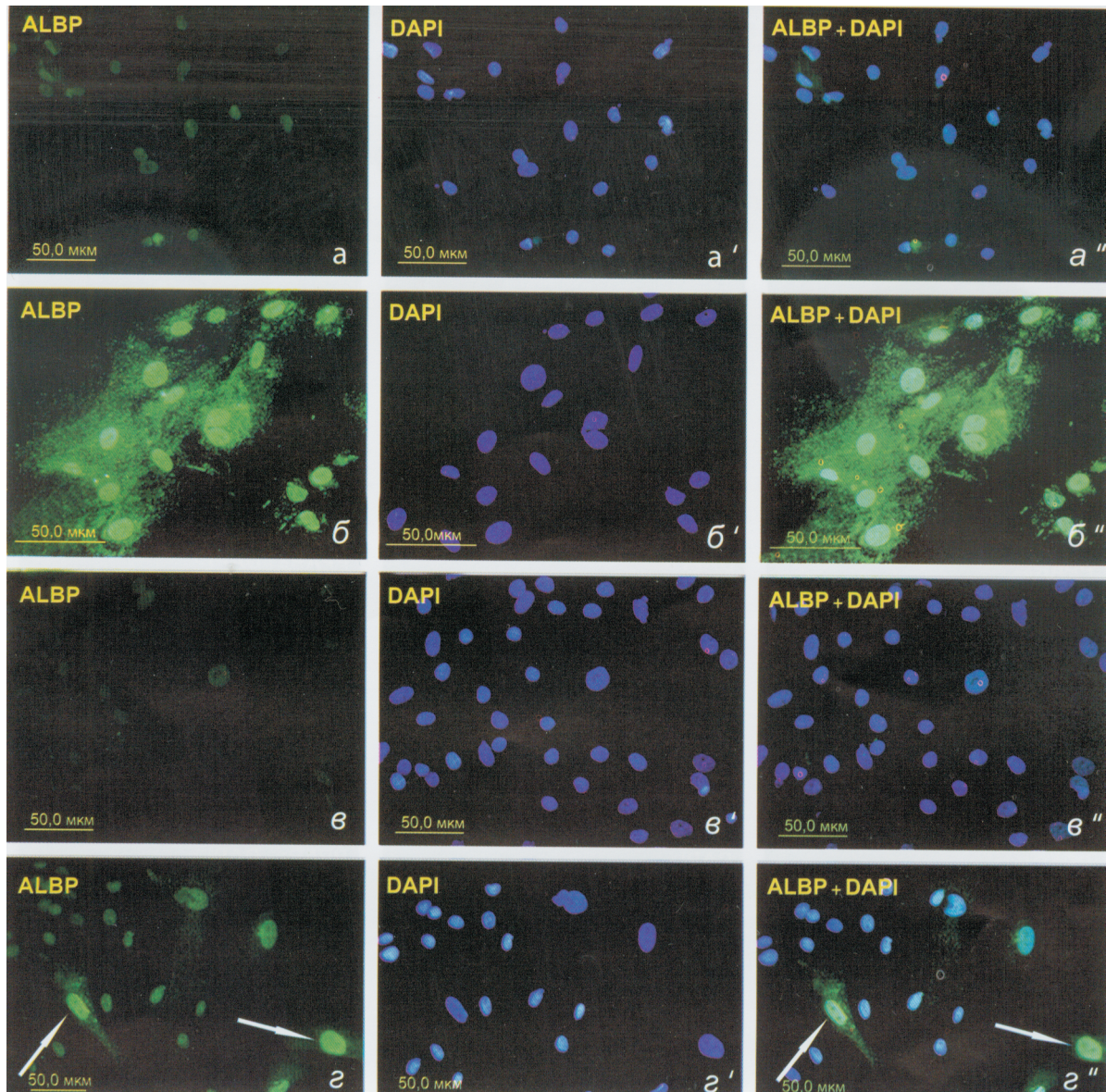


Рис. 7. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркера зрелых адипоцитов ALBP в МСК из костного мозга и зародышевой печени на 3-м пассаже.

a—a'' — МСК из костного мозга, культивируемые в стандартной ростовой среде (контроль); *б—б''* — МСК из костного мозга, культивируемые в адипогенной среде (опыт); *в—в''* — МСК из зародышевой печени, культивируемые в стандартной ростовой среде (контроль); *z—z''* — МСК из зародышевой печени, культивируемые в адипогенной среде (опыт). *a', б', в', z'* — ядра клеток, окрашенные с использованием DAPI; *a'', б'', в'', z''* — совмещение изображений результата иммуномечения клеток соответствующими антителами и их ядер, окрашенных DAPI. Стрелками указаны клетки с высоким содержанием белка ALBP как в ядрах, так и в цитоплазме.

стин, Домарацкая, 2001). На основании результатов проведенного нами анализа экспрессии структурных и регуляторных генов остеогенной дифференцировки на разных сроках культивирования печеночных МСК в индукционной среде можно также предположить наличие у этой популяции клеток потенциалов к остеогенной дифференцировке. Присутствие мРНК гена *RUNX2* и высокая экспрессия гена *SPPI* однозначно указывают на это. Тем не менее популяция печеночных МСК не способна реализовать терминальные этапы остеогенеза в созданных условиях *in vitro*, так как ни экспрессия белка остеокальцина, ни минерализация внеклеточного матрикса не обнаружены.

Оценка остеогенных потенциалов МСК из ЗП разными авторами неоднозначна. Так, известно, что МСК из пече-

ни зародышей человека первого триместра беременности обладают способностью к индуцированной дифференцировке в нескольких направлениях, в том числе и к остеогенезу (Campanoli et al., 2001; Gotherstrom et al., 2003, 2005). По другим данным, остеогенные потенциалы МСК из печени зародышей человека второго триместра беременности выражены слабее, чем МСК из других эмбриональных органов — КМ, селезенки и легкого (Anker et al., 2003). Кроме того, линии МСК из ЗП мыши в отличие от линий МСК из КМ в сравнимых экспериментальных условиях не способны к остеогенной дифференцировке, выраженной в формировании минерализованного внеклеточного матрикса (Fromigie et al., 2008). По-видимому, имеют место существенные межвидовые различия в дифференцировочных потенциалах МСК из ЗП. Нами не исклю-

чается возможность индуцирования остеогенеза в культурах печеночных МСК внесением дополнительных индукторов в среду. Нельзя не учитывать, что КМ является основным органом кроветворения на протяжении всего постнатального развития, тогда как ЗП выполняет свою кроветворную функцию в строго ограниченных временных рамках. Также необходимо отметить различную структурную организацию этих двух кроветворных органов. Все это, вероятно, оказывает влияние на микроокружение МСК (Fromiguet et al., 2008) и определяет статус этих клеток и их дифференцировочные потенции.

На основании морфологического анализа адипогенной дифференцировки с использованием фазово-контрастного инвертированного микроскопа и гистохимического окрашивания жировым красным О и суданом III и IV можно заключить, что появление первых жировых клеток в культуре МСК из КМ приходится на более ранние сроки, а сама дифференцировка протекает интенсивнее, чем в культуре МСК из ЗП. Вероятно, это связано с присутствием среди костномозговых МСК ближайших предшественников адипоцитов, быстро реализующих свою дифференцировочную программу в индукционной среде. Данное предположение подтверждается результатами ПЦР-анализа. На молекулярно-генетическом уровне регуляция адипогенной дифференцировки осуществляется через координированную работу целого комплекса регуляторных факторов, где ключевую роль играет ядерный рецептор PPAR γ . Увеличение уровня экспрессии гена *PPARG* на поздних сроках культивирования костномозговых МСК под влиянием индукторов связано с увеличением числа зрелых жировых клеток в культуре. Ядерный рецептор PPAR γ контролирует транскрипцию генов лептина *LEP* и *ALBP FABP4*, экспрессия которых специфична для зрелых адипоцитов (Tontonoz et al., 1994; Hollenberg et al., 1997). Действительно, в данной работе отмечено значительное усиление экспрессии гена *FABP4* на поздних этапах адипогенеза в культуре МСК из КМ. При этом интенсивность экспрессии гена *LEP* была гораздо ниже, чем экспрессия гена *FABP4*. Полученный результат находится в соответствии с результатами исследований других авторов, указывающих на значительно пониженную экспрессию гена лептина в клеточной линии 3T3-L1 *in vitro* по сравнению с белой жировой тканью (MacDougald et al., 1995). Наличие мРНК генов *PPARG*, *PPARD* и *FABP4* в контрольных культурах МСК из КМ, вероятно, связано с присутствием в добавляемой к среде сыворотке различных цитокинов, достаточных для коммитирования МСК в то или иное направление дифференцировки (Delorme et al., 2006). Напротив, низкая экспрессия генов *PPARG*, *PPARD* и *FABP4* и отсутствие мРНК гена *LEP* в опытных культурах печеночных МСК согласуются с гистохимическими данными, согласно которым численность адипоцитов в этой популяции клеток была сравнительно невысокой.

Иммуноцитохимическое выявление маркера зрелых адипоцитов *ALBP* и ядерного рецептора PPAR δ как в контрольных, так и в опытных культурах МСК из КМ полностью согласуется с результатами ПЦР-анализа и еще раз доказывает возможность реализации программы адипогенной дифференцировки клетками не только в присутствии индукторов адипогенеза, но и в стандартной ростовой среде. Данное предположение также подтверждается появлением в культурах МСК из КМ спонтанных дифференцировок в адипогенном направлении, т. е. в ростовой среде без добавления индукторов.

В сходных экспериментальных условиях в культуре МСК и ЗП экспрессия фактора транскрипции PPAR δ и маркера зрелых адипоцитов *ALBP* была выражена слабее по сравнению с таковой в МСК из КМ. Отмечено, что *ALBP* в основном локализовался в ядре, за исключением некоторых клеток, у которых этот белок обнаруживался и в цитоплазме. Проведенный иммунофлуоресцентный анализ свидетельствует о менее выраженных адипогенных потенциях печеночных МСК по сравнению с таковыми МСК из КМ. Следует обратить внимание на то, что белок *ALBP* обнаружен не только в цитоплазме, но и в клеточном ядре. Это объясняется его ролью транспортера жирных кислот в ядро клетки, где последние выступают в качестве специфических лигандов для ядерного рецептора PPAR γ (Helledie et al., 2002).

Итак, совокупность собственных экспериментальных данных позволяет заключить: исследованные клеточные популяции из двух кроветворных органов — зародышевой печени и зрелого костного мозга — отвечают критериям МСК, однако их остеогенные и адипогенные потенции в сравнимых экспериментальных условиях культивирования неодинаковы, что, возможно, связано с различием в программах пре- и постнатального гистогенеза этих клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48209) и гранта президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ, проект 1134.2008.4).

Список литературы

- Пирс Э. 1962. Гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 962 с.
- Старостин В. И., Домарацкая Е. И. 2001. Хондро- и остеогенез в эктопических трансплантатах печени зародышевой мышцы. Онтогенез. 32 : 114—117.
- Стрелков П. Б. 1999. Таблицы Стрелкова и экспресс-метод статистической обработки данных. М.: ПАИМС. 96 с.
- Anker P., Noort W. A., Scherjon S. A., Kleijburg-van der Keur C., Kruisselbrink A. B., Bezooijen R. L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H., Fibbe W. E. 2003. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. Haematologica. 88 : 845—852.
- Campagnoli C., Roberts I., Kumar S., Bennett P. R., Bellantuono I., Fisk N. M. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood. 98 : 2396—2402.
- Chagraoui J., Lepage-Noll A., Anjo A., Uzan G., Charbord P. 2003. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. Blood. 101 : 2973—2982.
- Charbord P., Oostendorp R., Pang W., Hérault O., Noel F., Tsuji T., Dzierzakand E., Peault B. 2002. Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal, and postnatal mouse blood-forming tissues. Exp. Hematol. 30 : 1202—1210.
- Chateauvieux S., Ichante J., Delorme B., Frouin V., Pietu G., Langonne A., Gallay N., Sensebe L., Martin M. T., Moore K. A., Charbord P. 2007. Molecular profile of mouse stromal mesenchymal stem cells. Physiol. Genomics. 29 : 128—138.
- Delorme B., Charbord P. 2007. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. In: Tissue engineering. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 67—81.
- Delorme B., Chateauvieux S., Charbord P. 2006. The concept of mesenchymal stem cells. Regenerative Med. 1 : 497—509.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchy-

mal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*. 8 : 315—317.

Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4 : 267—274.

Fromiguet O., Hamidouche Z., Chateauvieux S., Charbord P., Marie P. J. 2008. Distinct osteoblastic differentiation of murine fetal liver and bone marrow stroma-derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 104: 620—628.

Fukada S., Miyagoe-Suzuki Y., Tsukihara H., Yuasa K., Higuchi S., Ono S., Tsujikawa K., Takeda S., Yamamoto H. 2002. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J. Cell Sci.* 115 : 1285—1293.

Gotherstrom C., Ringden O., Westgren M., Tammik C., Le Blanc K. 2003. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplantation*. 32 : 265—272.

Gotherstrom C., West A., Liden J., Uzunel M., Lahesmaa R., Le Blanc K. 2005. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica*. 90 : 1017—1026.

Guillot P. V., Gotherstrom C., Chan J., Kurata H., Fisk N. M. 2007. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells*. 25 : 646—654.

Helledie T., Jorgensen C., Antonius M., Krogsdam A., Kratchmarova I., Kristiansen K., Mandrup S. 2002. Role of adipocyte lipid-binding protein (ALBP) and acyl-CoA binding protein (ACBP) in PPAR-mediated transactivation. *Mol. Cell. Biochem.* 239 : 157—164.

Hollenberg A. N., Susulic V. S., Madura J. P., Zhang B., Moller D. E., Tontonoz P., Sarraf P., Spiegelman B. M., Lowell B. B. 1997. Functional antagonism between CCAAT/enhancer binding protein- α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ on the leptin promoter. *J. Biol. Chem.* 272 : 5283—5290.

Kim I., Saunders T. L., Morrison S. J. 2007. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell*. 130 : 470—483.

Lazarus H. M., Haynesworth S. E., Gerson S. L., Caplan A. I. 1997. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J. Hematother.* 6 : 447—455.

Lee M. H., Kwon T. G., Park H. S., Wozney J. M., Ryoo H. M. 2003. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but

is independent of Runx2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 : 689—694.

Liu W., Toyosawa S., Furuichi T., Kanatani N., Yoshida C., Liu Y., Himeno M., Narai S., Yamaguchi A., Komori T. 2001. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J. Cell Biol.* 155 : 157—166.

MacDougald O. A., Hwang C. S., Fan H., Lane M. D. 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 9034—9037.

Machaj E. K., Grabowska I., Gajkowska A., Jastrzevska M., Oldak T., Moraczewski J., Pojda Z. 2005. Differentiation potential of the fetal rat liver-derived cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 43 : 217—222.

Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119 : 2204—2213.

Mendes S. C., Robin C., Dzierzak E. 2005. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*. 132 : 1127—1136.

Metcalf D., Moore M. A. S. 1971. *Haemopoietic cells*. Amsterdam; London: North-Holland. 550 p.

Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J. M., Behringer R. R., Crombrugge B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 108 : 17—29.

Stevens A., Lowe J. S. 1993. *Musculoskeletal system*. In: *Histology*. St. Louis etc.: Mosby. 226—248.

Tontonoz P., Graves R. A., Budavari A., Erdjument-Bromage H., Lui M., Hu E., Tempst P., Spiegelman B. M. 1994. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ and RXR α . *Nucl. Acids Res.* 22 : 5628—5634.

Van Den Heuvel R., Versele S., Schoeters G., Vanderborgh O. 1987. Stromal stem cells (CFU-f) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice. *Br. J. Haematol.* 66 : 15—20.

Wexler S. A., Donaldson C., Denning-Kendall P., Rice C., Brandley B., Hows J. M. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal «stem» cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.* 121 : 368—374.

Поступила 18 XI 2008

MOLECULAR GENETIC AND IMMUNOPHENOTYPIC ANALYSIS OF ANTIGEN PROFILING, OSTEOGENIC AND ADIPOGENIC POTENTIALS OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM FETAL LIVER AND ADULT BONE MARROW IN RATS

M. N. Kozhevnikova,¹ A. S. Mikaelyan, V. I. Starostin

Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS, Moscow;

¹ e-mail: mn_kozhevnikova@mail.ru

Comparative characteristics of mesenchymal stromal cells (MSC) from fetal liver and adult bone marrow are of great interest due to similar contribution to organization of the hematopoietic microenvironments in these organs in different developmental periods. It is known that MSC play a pivotal role in organization of hematopoietic stem cells «niches». Moreover, the histogenetic affinity between MSC from both sources is not ruled out. Antigen profiling using immunocytochemistry and RT-PCR confirmed that cell populations under study corresponded to MSC criteria and had no hematopoietic, lymphoid and endothelial cells after second passage. Comparative analysis of osteogenic and adipogenic marker expression revealed distinct differentiation potentials of MSC from two hematopoietic organs: adipogenic potentials of hepatic MSC was weaker but ability to differentiate to osteogenic lineage was extremely low, if any, in comparison with marked osteo- and adipogenic potentials of adult bone marrow MSC. Similar cell phenotype but unequal differentiation potentials under identical conditions *in vitro* may be attributed to a distinct developmental program in pre- and postnatal histogenesis of MSC from different sources.

Key words: mesenchymal stromal cells, bone marrow, fetal liver, pre- and postnatal development, osteogenesis, adipogenesis.