

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕЙРОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА, ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ЭНДОМЕТРИЯ

© В. И. Земелько,<sup>1</sup> И. В. Кожухарова,<sup>1, 2</sup> Л. Л. Алексеенко,<sup>1</sup> А. П. Домнина,<sup>1</sup>  
Г. Ф. Решетникова,<sup>1, 2</sup> М. В. Пузанов,<sup>1</sup> Р. И. Дмитриева,<sup>1</sup> Т. М. Гринчук,<sup>1, 2</sup>  
Н. Н. Никольский,<sup>1</sup> С. В. Анисимов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН и <sup>2</sup> Федеральный центр сердца, крови  
и эндокринологии им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: vzetelko@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) могут быть выделены из многих тканей взрослого организма и являются ценным субстратом заместительной и восстановительной клеточной терапии многих заболеваний и травм. При этом пластичность разных типов МСК неодинакова. В настоящем исследовании проводили сравнительный анализ нейрогенного потенциала трех видов МСК человека: МСК костного мозга (КМ), МСК подкожной жировой ткани (ЖТ) и МСК эндометрия (выделенных из менструальной крови) (эМСК). Было показано, что изначально все три культуры МСК обладают мультипотентной пластичностью и предрасположенностью к нейрогенезу, что выражается в экспрессии маркеров плюрипотентности SSEA-4 и нейрональных предшественников — нестина и бета-III-тубулина. Дальнейший анализ выявил наличие транскрипции нейронального маркерного гена *MAP2* и *нейротрофина-3 (NT-3)* в недифференцированных МСК КМ и ЖТ, а в культуре эМСК — высокий базальный уровень синтеза нейротрофического фактора головного мозга (BDNF). Стимуляция нейральной индукции такими агентами, как 5-азациитидин, рекомбинантный основной фактор роста фибробластов человека (bFGF), рекомбинантный эпидермальный фактор роста человека (EGF), рекомбинантный фактор роста фибробластов человека 8 (FGF8), морфоген SHH (sonic hedgehog), ретиноевая кислота (RA) и изобутилметилксантин (IBMX), показала дополнительные различия в нейрогенном потенциале исследованных МСК. Компоненты внеклеточного матрикса, такие как матригель и ламинин, также являлись важными индукторами дифференцировки. Так, в МСК КМ наиболее эффективная нейральная индукция проходила без участия RA с предварительной обработкой клеток 5-азациитидином, а для эМСК RA являлась необходимым агентом нейральной дифференцировки, стимулируя транскрипцию *нейротрофина-4 (NT-4)* и усиление секреции BDNF. При этом в эМСК использование ламинина в качестве субстрата было решающим, а инкубирование клеток с 5-азациитидином необязательным. В случае МСК из ЖТ RA в сочетании с 5-азациитидином вызывала активацию экспрессии гена *MAP2*, но уменьшала секрецию BDNF. Таким образом, влияние RA на нейральную дифференцировку МСК ЖТ является неоднозначным и наряду с изучением сигнальных путей ее воздействия на МСК требует дальнейших исследований. Терапевтический эффект трансплантированных МСК, как правило, объясняется их паракриной активностью. Высокий базальный уровень синтеза BDNF в культуре эМСК наряду с высоким уровнем пролиферации и инвазивным методом выделения этих клеток служит весомым аргументом для использования предрасположенных к нейрогенезу интактных эМСК в качестве субстрата клеточной терапии для регенерации нервной ткани.

Ключевые слова: клеточная терапия, мезенхимные стволовые клетки.

Принятые сокращения: ГСК — гемопоэтические стволовые клетки, КМ — красный костный мозг, МСК — мезенхимные стволовые клетки, ЖТ — жировая ткань, эМСК — мезенхимные стволовые клетки эндометрия, выделенные из менструальной крови, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки.

Стволовые и прогениторные клетки выполняют *in vivo* важнейшие биологические функции, определяя ход процессов роста, развития, адаптации и регенерации. При этом нарушение функциональных свойств циркулирующих и резидентных прогениторных и стволовых клеток, развивающееся в результате генетических, метаболических и иных нарушений, определяет задержку роста и развития, снижение адаптивного и регенеративного по-

тенсиалов организма (Molero, 2009; Thornell, 2009). Наиболее обширной нишей стволовых клеток взрослого организма является красный костный мозг (КМ), основными популяциями стволовых клеток в котором являются гемопоэтические (кроветворные) стволовые клетки (ГСК) и мезенхимные стволовые клетки (МСК). МСК из КМ и иных тканей выполняют широкий спектр функций, обеспечивая трофику и поддержку клеток других типов

(в КМ — это ГСК), синтезируя и секретируя факторы роста и компоненты сигнальных каскадов, обладая при этом высоким уровнем пластичности (Prockop, 2009; Schraufstatter, 2011).

В настоящее время МСК взрослых широко используются в качестве объекта исследований механизмов пролиферации, дифференцировки и межклеточных взаимодействий. Кроме этого, весьма актуальной является разработка подходов к лечению различных заболеваний и травм, основанных на принципах клеточной терапии с помощью МСК или их производных. По совокупности своих свойств МСК обладают целым рядом преимуществ перед всеми другими типами стволовых клеток. Хотя по пролиферативному потенциалу МСК уступают эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК), индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам и ГСК, они генетически более стабильны, более доступны для использования, которое не связано с этическими трудностями (Анисимов и др., 2009).

В течение последнего десятилетия было установлено, что уровень пластичности МСК гораздо шире, чем считалось ранее: они способны дифференцироваться не только в многочисленные типы клеток мезенхимного происхождения, включая клетки костной, хрящевой, мышечной, сухожильной и жировой тканей, но также в клетки других направлений, включая глиальные и нейроны (Woodbury et al., 2000). Это было продемонстрировано как для МСК животных, так и для МСК человека. Эти обстоятельства определяют привлекательность МСК как потенциального субстрата клеточной терапии, в том числе нейродегенеративных заболеваний.

Хотя МСК относительно скупо представлены в составе КМ (0.010—0.001 % от общего числа ядерных клеток), технология выделения МСК из аспирата КМ не представляет технических сложностей. Однако само проведение пункции костного мозга связано с определенным количеством осложнений. Оно бывает затруднено в определенных клинических ситуациях, а мобилизация стволовых клеток КМ в периферический кровоток при помощи фармацевтических воздействий (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора; нейпогена) является весьма дорогостоящей процедурой. Поэтому большое значение имеет возможность использования в качестве субстратов клеточной терапии альтернативных костному мозгу источников МСК.

Клетки со свойствами МСК выделены из широкого спектра тканей взрослых, включая подкожную висцеральную жировую ткань, ткань скелетных мышц, хрящей, сухожилий, пульпы зуба, эндометрия, периодонтальную связку, синовиальную мембрану и легкие. Высказано предположение о том, что популяции резидентных МСК существуют практически во всех органах и тканях взрослых (Da Silva Meirelles et al., 2006); при этом МСК разного происхождения имеют некоторые различия по ряду параметров (Dmitrieva et al., 2012). Подкожная жировая ткань (ЖТ) и менструальная кровь (содержащая клетки эндометрия) расцениваются в настоящее время как наиболее доступные субстраты для выделения МСК.

В настоящей работе мы провели сравнительный анализ нейрогенного потенциала МСК КМ, подкожной ЖТ и выделенных из менструальной крови эндометриальных МСК (эМСК) человека.

## Материал и методика

Процедуру забора образцов аспирата КМ и подкожной ЖТ проводили в клинике ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург); забор образцов менструальной крови производили в Международном центре репродуктивной медицины (Санкт-Петербург). Исследования проводили в соответствии со стандартами Хельсинкской декларации (1989).

Аспирацию КМ проводили в асептическом боксе под местной анестезией путем однократной пункции аспирационной иглой (13G или 14G) из подвздошной кости или рукоятки грудины; общий объем аспирата КМ составлял 3.0—6.0 мл; антикоагуляцию проводили в готовых пробирках (BD Biosciences, США), содержащих дикальиевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (K<sub>2</sub>-ЭДТА) в концентрации 1.8 мг на 1 мл КМ. Образцы транспортировали в лабораторию при 4 °С, выделение клеток начинали в течение 4 ч после забора.

Аспирацию подкожной ЖТ проводили в асептическом боксе под местной анестезией из левой околопупочной области путем однократной пункции толстой иглой (19G); общий объем аспирата ЖТ составлял 0.3—0.5 мл. Образцы транспортировали в лабораторию при 4 °С, выделение клеток начинали в течение 2 ч после забора.

Забор менструальной крови проводили на 2-й день менструального цикла. Кровь собирали аспиратором Iras MVA plus с насадкой диаметром 4 мм, введенным в цервикальный канал до внутреннего зева. В среднем от каждой пациентки получали 1.0—2.0 мл крови. Полученный образец переносили в фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) (Sigma, США) с добавлением цитрата натрия и 1 % смеси антибиотика и антимикотика (смесь пенициллина, стрептомицина и амфотерицина) (Sigma, США). В этом растворе при 4 °С менструальную кровь доставляли в лабораторию в течение 2—4 ч.

Первичные культуры МСК. Образцы аспирата КМ разводили в 4 раза стерильным PBS и использовали для выделения мононуклеарных клеток КМ (МККМ) методом сепарации в градиенте плотности, с применением реагента Ficoll-Paque PLUS (Amersham, США). МККМ (10—20 млн) высаживали в культуральные флаконы и культивировали в стандартных условиях (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °С) сначала (1—2 пассажа) в питательной среде альфа-МЕМ (Биолот, Россия), а затем в DMEM/F12 (Invitrogen, США), содержащей 10 % оптимизированной для МСК эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; HyClone, США), 1 % смеси антибиотиков (пенициллина и стрептомицина) и 1 % глутамакса (Invitrogen, США). Неадгезивные клетки отмывали через 48 ч; пассажи МСК КМ проводили по достижению субконфлюэнтности, используя 0.05 % раствора трипсина и ЭДТА (Invitrogen, США).

Образец аспирата ЖТ отмывали от видимых сгустков крови стерильным сбалансированным солевым раствором Хенкса (HBSS; Биолот, Россия) и механически диссоциировали. Энзиматическую диссоциацию проводили с использованием стерильного раствора коллагеназы III (5 мг/мл) (Worthington, США) на стерильном HBSS в течение 20—30 мин. После нейтрализации коллагеназы 10%-ной FBS все клетки высаживали в культуральные флаконы и культивировали, как описано выше для МСК КМ.

Образец менструальной крови в растворе центрифугировали. Осадок, содержащий фрагменты эндометрия, ресуспендировали в PBS, содержащем 10 % смеси анти-

биотика и антимикотика, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Повторно отцентрифугированные клетки переносили в культуральные флаконы T25 (Fisher Scientific, США). Для получения адгезивной клеточной популяции клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % FBS, 1 % смеси антибиотика и антимикотика и 1 % глутамакса. Клетки культивировали в стандартных условиях в течение 3—7 сут, меняя среду несколько раз. Полученную адгезивную популяцию клеток (4—9 млн) пересевали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA 2 раза в неделю в соотношении 1 : 3.

Проточная цитофотометрия. Суспензию одноклеточных клеток МСК получали при помощи 0.05%-ного трипсина и EDTA. Клетки (1 млн/мл) ресуспендировали в растворе PBS, содержащем 5 % FBS. Для анализа использовали антитела к Маркерам CD9, CD14, CD34, CD44, CD45, CD90, CD11a, CD13, CD19, CD29, CD73, CD105, CD117, CD146, HLA-DR, конъюгированные с фикоэритрином (PE), или с флуоресцеинизоцианатом (FITC), или с аллофикоцианином (APC) (Becton-Dickinson BioSciences, США). Иммунофенотипический анализ полученных эМСК на поверхностные CD-Маркеры проводили с использованием проточных цитофлуорометров Epics XL (Beckman Coulter, США) и BD FACS Calibur с использованием программного обеспечения CELLQuest.

Нейральная дифференцировка МСК *in vitro*. МСК диссоциировали с помощью 0.05%-ного трипсина и EDTA и пересевали в чашки Петри диаметрами 35 (по 100 тыс. клеток) и 60 (по 300 тыс. клеток) мм с покровными стеклами, покрытыми матригелем (Matrigel; BD Bioscience, США) или ламинином (50 мкг/мл) (Sigma, США). Для индукции нейральной дифференцировки использовали два протокола.

Согласно протоколу 1, на следующий день ростовую среду в чашках меняли на дифференцировочную бессывороточную среду, состоящую из DMEM/F12, 1 % смеси антибиотика и антимикотика, 1 % глутамакса, 1 % реагента B27 (B27 supplement; Gibco, США), 1 % реагента N2 (N2 supplement; Gibco, США), 25 нг/мл рекомбинантного основного фактора роста фибробластов человека (bFGF; BD Bioscience, США) и 25 нг/мл рекомбинантного эпидермального фактора роста человека (EGF; CALBIOCHEM, США). Через 2 сут, не меняя среду, в нее добавляли 1 мкМ ретиноевой кислоты (RA; Sigma, США) и 0.25 мМ изобутил-метилксантина (IBMX; Sigma, США) на 1—2 сут для МСК КМ и ЖТ и на 4 сут для эМСК. Для выявления наиболее эффективной индукции нейральной дифференцировки для различных МСК эксперименты проводили как с предварительным инкубированием клеток с 10 мкг/мл 5-азациитидина в ростовой среде в течение 2 сут, так и без добавления ретиноевой кислоты.

Согласно протоколу 2, ростовую среду в чашках через 1 сут заменяли на дифференцировочную, состоящую из DMEM/F12, 1 % смеси антибиотика и антимикотика, 1 % глутамакса, 1 % реагента B27, 1 % реагента N2, 250 нг/мл SHN (sonic hedgehog, R@D, США), 50 нг/мл bFGF и 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста фибробластов человека 8 (FGF8; R@D, США). Через 2 сут инкубации без смены среды в нее добавляли 1 мкМ RA и 0.25 мМ IBMX на 1—2 сут для МСК КМ и на 4 сут для эМСК.

Иммуноцитохимия. Флуоресцентное окрашивание антигенов нестина, бета-III-тубулина, промежуточных нейрональных филаментов (NF-H), нейрональных ядер (NeuN), глиального кислого фибриллярного белка

(GFAP) и взаимодействующего с микротубочками белка MAP2 проводили согласно стандартному протоколу. Клетки фиксировали 4%-ным раствором формалина, пермеабилizовывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 (Merk, США). Неспецифическое связывание блокировали, используя 1%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma, США) и 5%-ный раствор козьей сыворотки (Sigma, США) на PBS, в течение 30 мин. Использовали мышиные моноклональные антитела против бета-III-тубулина в разведении 1 : 1000 (Chemicon, США), против NF-H (Abcam, США), NeuN (Millipore, США) и MAP2 (Millipore, США) в соотношении 1 : 100, а также кроличьи поликлональные антитела против нестина (1 : 100; Chemicon, США), бета-III-тубулина (1 : 100; Sigma, США) и GFAP (1 : 100; Abcam, США). Клетки с первыми антителами инкубировали не менее 12 ч (ночь) при 4 °С. В качестве вторых антител использовали козы антимышинные иммуноглобулины от компании Jackson Immunoresearch (США), Dylight 488 (1 : 400), CY3 (1 : 300) (Chemicon, США) или козы антикроличьи антитела, конъюгированные с CY2 (1 : 300). Ядра окрашивали раствором DAPI (Merk, США) в концентрации 1 мкг/мл. Готовые покровные стекла заливали 2%-ным раствором пропиленглата и анализировали с помощью микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия) и камеры Lieca DFC 420C (Германия), а также с помощью конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS CL (Германия). Для иммунофлуоресцентного анализа поверхностного антигена SSEA-4 живые клетки инкубировали с мышиными моноклональными антителами против SSEA-4 (Chemicon, США) в разведении 1 : 50 в течение 30—40 мин. Затем клетки фиксировали 15 мин 4%-ным раствором формальдегида (Sigma, США) на PBS. Несвязавшиеся антитела отмывали раствором PBS, содержащим 0.1%-ный Tween-20, и блокировали от неспецифического связывания 1%-ным раствором BSA. Далее следовали вышеуказанному протоколу.

Определение экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для анализа геной экспрессии тотальную РНК выделяли с помощью системы RNeasy Micro Kit (QIAGEN, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Синтез кДНК проводили с использованием 500 нг тотальной РНК при помощи системы RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Специфичные гены были амплифицированы с использованием полимеразы Taq DNA polymerase (Fermentas, Литва) на амплификаторе Cusco Temp (СТМ, Россия) по следующей программе: горячий старт — денатурация при 93 °С в течение 3 мин, отжиг праймеров при 56—70 °С в течение 2 мин, удлинение цепи при 72 °С в течение 1.5 мин, затем 26—40 циклов: денатурация при 93 °С 45 с; отжиг праймеров при 56—70 °С 1 мин; удлинение цепи при 72 °С в течение 1.5 мин; завершающее удлинение цепи — 72 °С, 10 мин. Для анализа экспрессии генов использовали следующие праймеры. *NeuN*: прямой 5'TTTAACGAGCGGGGCTCCAAG3' и обратный 5'TTCATGGTCCGAGAAGGAA-ACG3', температура отжига 65 °С (размер продукта амплификации 578 п. н.); *β-III-tubulin*: прямой 5'GGATTCGGTCTGGATGTGG 3' и обратный 5'AAGC-CGGGCATGAAGAAGTG3', температура отжига 61 °С (471 п. н.); *MAP2*: прямой 5'GGGAAGAGTGGTACCT-CAACA3' и обратный 5'TTGGCTGTCAATCTTGACAT3', температура отжига 61 °С (525 п. н.); *NF-H*: прямой



5'GAAAAGCACCAAGGACTCAC3' и обратный 5'GGTGACTTTGCCTCTTCCTT3', температура отжига 57 °С (576 п. н.); *GFAP*: прямой 5'GTGGTACCGCTCCAAGTTTG-CAG3' и обратный 5'AATGGTGATCCGGTTCTCCTC3', температура отжига 65 °С (373 п. н.); *нейротрофин-3 (NT-3)*: прямой 5'TACGCGGAGCATAAGAGTCA3' и обратный 5'GGCACACACAGGACGTGTC3', температура отжига 65 °С (333 п. н.); *нейротрофин-4 (NT-4)*: прямой 5'CTTTCGGGAGTCAGCAGGTGC3' и обратный 5'CAGGCAGTGTCAATTCTGAATCC3', температура отжига 65 °С (399 п. н.).

В качестве количественного контроля РНК и исключения контаминации ДНК в реакции обратной транскрипции использовали ген *β-actin*: прямой праймер 5'GCCGAGCGGGAAATCGTGC3' и обратный 5'CGGTGGACGATGGAGGGCCG3', температура отжига 70 °С (507 п. н.).

Электрофорез амплифицированного продукта проводили в 2%-ном агарозном геле, содержащем буфер ТАЕ с бромистым этидием (Sigma, США). В качестве маркера молекулярной массы использовали 100 Kb DNA ladder (Gibco, США). Визуализацию проводили в ультрафиолетовом свете (длина волны 302 нм) при помощи прибора Transilluminator, регистрируя изображения цифровой фотокамерой Canon.

Выявление синтеза нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в дифференцированных МСК методом ELISA. Иммуноферментный анализ культуральной среды нейрально-дифференцированных МСК проводили, используя набор реагентов DuoSet ELISA Development System for human BDNF (R&D systems, США). Протокол согласно рекомендациям фирмы-производителя состоял в следующем: на подготовленные 96-луночные платы наносили стандартный рекомбинантный фактор BDNF человека в качестве позитивного контроля и супернатант клеток до и после дифференцировки *in vitro*. После инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре добавляли биотинилированные антитела против BDNF человека и выдерживали в течение 2 ч при комнатной температуре. Для выявления связанных антител использовали стрептавидин,

конъюгированный с пероксидазой хрена, субстратом реакции служил раствор тетраметилбензидина в смеси с перекисью. На каждом этапе обработки лунки промывали 3 раза 0.05%-ным раствором Tween-20 на PBS. Цветную реакцию регистрировали с помощью измерения оптической плотности раствора при длине волны 450 нм на иммунохимическом анализаторе ФЛЮОРОФОТ (Германия). Все измерения были проведены в двух повторностях.

## Результаты и обсуждение

Заместительная и восстановительная клеточная терапия имеет широкие перспективы в лечении многих заболеваний. Применение аутологичных МСК взрослых не связано с этическими затруднениями, а также снимает риск туморогенности (Murphy et al., 2008) и иммунного отторжения, ограничивающих клиническое использование ЭСК человека. Изучением МСК как альтернативного источника стволовых клеток для лечения нейродегенеративных заболеваний, стали заниматься достаточно давно (Woodbury et al., 2002; Jori et al., 2005). К настоящему времени описано несколько эффективных протоколов нейральной дифференцировки МСК *in vitro* (Blondheim et al., 2006; Borlongan et al., 2010; Jang et al., 2010), в том числе основанных на применении 5-азациитидина (Kang et al., 2003; Lee, Yoon, 2008) и морфогена SHH совместно с ростовым фактором FGF8 (Long et al., 2005; Trzaska et al., 2007). Однако настоящая работа является первым опытом систематического анализа нейрогенного потенциала трех типов МСК человека: в работе сходного дизайнера (Zhang et al., 2012) сравнивали МСК КМ и ЖТ, но не ЭМСК.

Идентификация и фенотипический анализ выделенных МСК человека. Иммунофенотип МСК был охарактеризован в соответствии с рекомендациями Международного общества клеточной терапии (ISCT) (Dominići et al., 2006). Чтобы подтвердить, что выделенные нами из КМ, подкожной ЖТ и ткани эндометрия первичные культуры представляют собой популяции МСК, анализировали содержание поверхностных

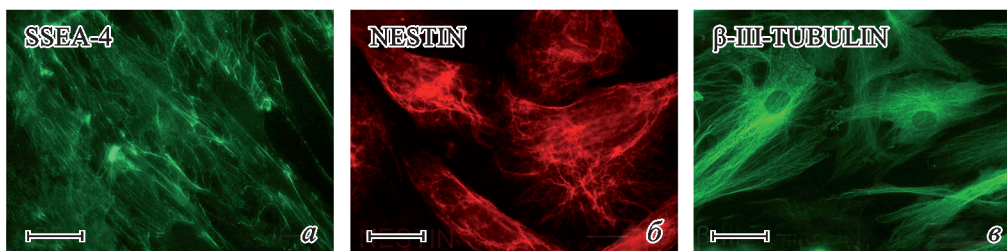
**Количественный анализ экспрессии поверхностных антигенов для ЭМСК и МСК КМ и ЖТ**

Поверхностный маркер	Доля маркера, %		
	МСК КМ	МСК ЖТ	ЭМСК
CD9	НИ	НИ	98.00 ± 1.20
CD13	»	»	99.75 ± 0.15
C29	»	»	99.90 ± 0.10
CB44	»	»	99.60 ± 0.10
CD73	66.64 ± 19.50	34.27 ± 19.42	99.90 ± 0.10
CD90	72.64 ± 17.20	57.94 ± 22.66	95.35 ± 1.35
CD105	59.21 ± 17.00	96.22 ± 3.59	99.80 ± 0.10
CD146	20.96 ± 14.04	21.33 ± 8.81	94.45 ± 0.45
CB11a	НИ	НИ	3.32 ± 2.76
CD19	4.03 ± 0.10	»	0.28 ± 0.10
CD34	2.35 ± 0.10	0.55 ± 0.10	0.22 ± 0.20
CD45	0.07 ± 0.10	0.47 ± 0.10	0.80 ± 0.10
CD117	НИ	НИ	3.73 ± 2.91
HLA-DR	»	»	0.93 ± 0.47

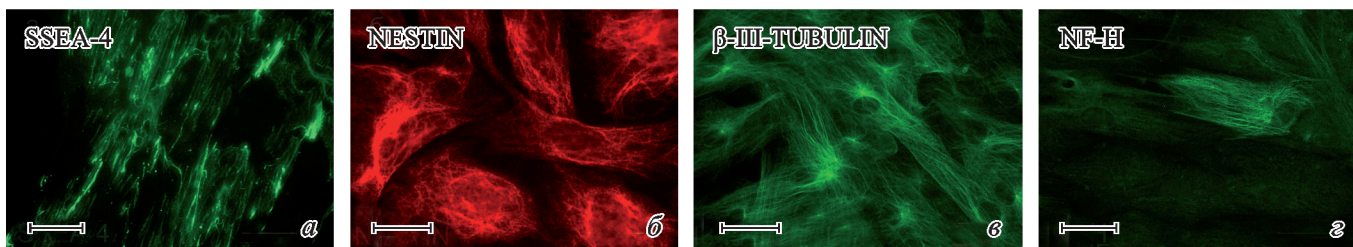
Примечание. НИ — не измеряли.



КМ



ЖТ



эмСК

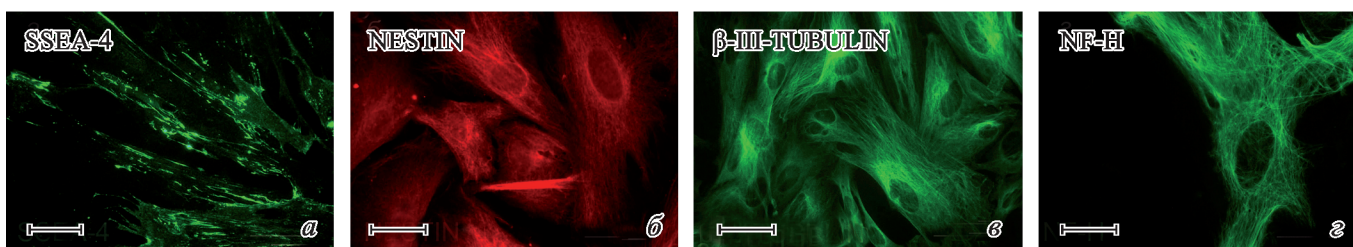


Рис. 1. Экспрессия фенотипических маркеров МСК костного мозга (КМ), подкожной жировой ткани (ЖТ) и эндометрия (эмСК). а—в — маркеры SSEA-4, нестин и бета-III-тубулин соответственно; г — экспрессия антигена промежуточных нейрональных филаментов (NF-H). Масштабные отрезки: КМ — 25 (а, б) и 15 (в) мкм; ЖТ — 25 (а, в, г) и 15 (б) мкм; эмСК — 25 (а, в) и 15 (б, г) мкм.

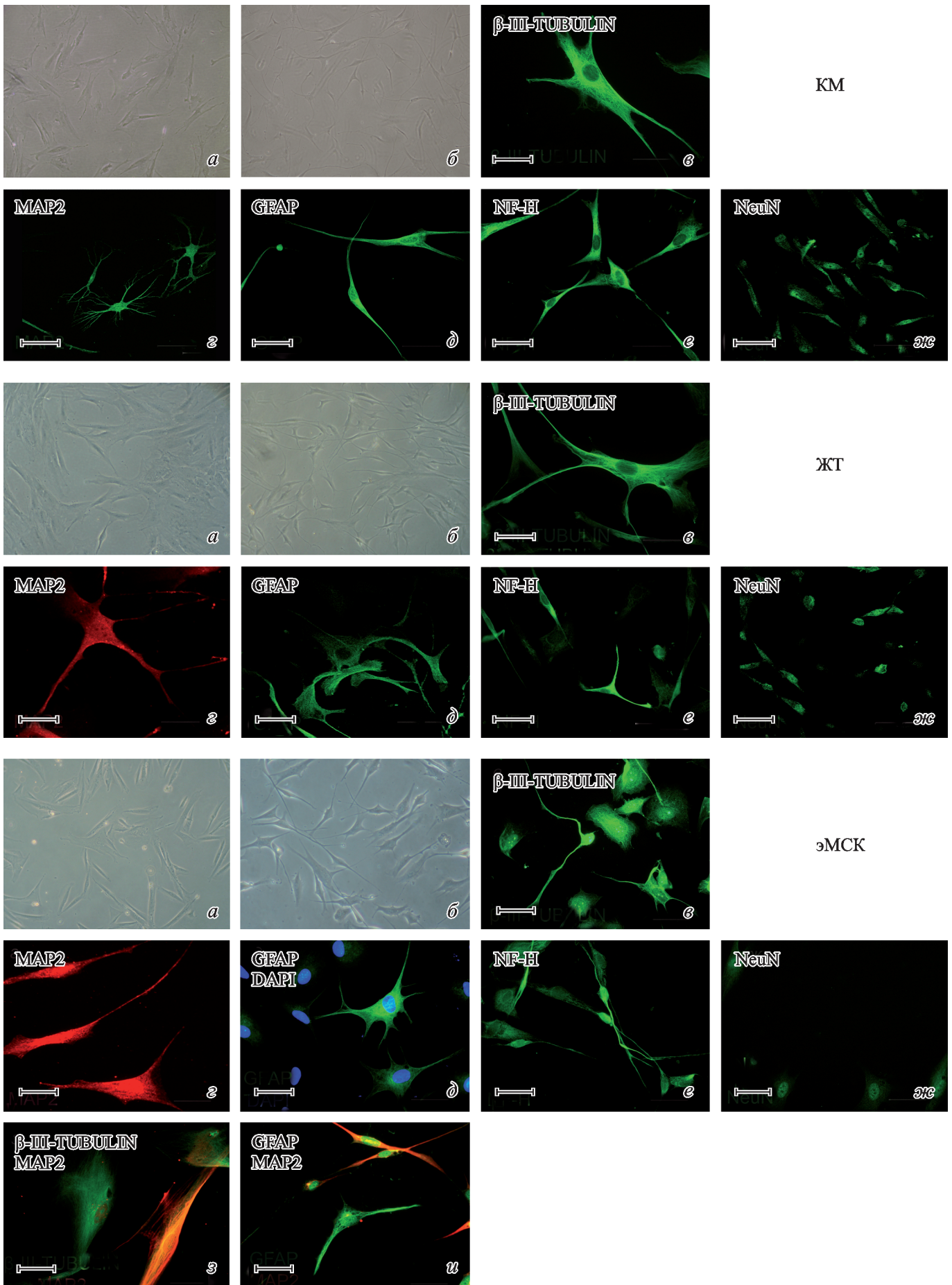
маркеров МСК методом проточной цитофотометрии. В приведенной выше таблице отражен количественный анализ экспрессии поверхностных антигенов для эмСК и МСК КМ и ЖТ. Так, выделенные эмСК экспрессируют такие поверхностные маркеры, как CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, и не экспрессируют гемопоэтические маркеры CD11a, CD19, CD 34, CD45, CD117 и HLA-DR (класса II), а МСК КМ и ЖТ экспрессируют CD105, CD73 и CD90 и не экспрессируют CD45, CD34 и CD14. Эти результаты совпадают не только с критериями ISCT для фенотипирования МСК человека по экспрессии поверхностных маркеров, но и с многочисленными результатами других исследователей (Pettinger et al., 1999; Buhring et al., 2007; Gargett, Masuda, 2010; Hussein, Thiemermann, 2010). Морфологически все выделенные МСК представляли собой монослой фибробластоподобных клеток с характерными круговыми завихрениями.

Иммунофлуоресцентный анализ всех полученных культур МСК показал фенотипическую экспрессию (около 70 %) маркера мультипотентности SSEA-4 (рис. 1, КМ а, ЖТ а и эмСК а), маркера ранних нейрональных предшественников нестина (рис. 1, КМ б, ЖТ б и эмСК б), а также маркера поздних нейрональных предшественников бета-III-тубулина (рис. 1, КМ в, ЖТ в и эмСК в). Экспрессия антигена SSEA-4 характерна для ЭСК. Но в отличие от равномерного его распределения по мембране ЭСК локализация этого поверхностного антигена у МСК сосредоточена в местах фокальных контак-

тов. Ранее уже была показана экспрессия этого маркера мультипотентности для МСК КМ (Gang et al., 2007) и ЖТ (Riekstina et al., 2009) и для эмСК (Patel et al., 2008; Земелько и др., 2011).

В 2006 г. для МСК КМ показана экспрессия 12 нейрональных генов (включая маркер ранних нейрональных предшественников нестин), 8 дофаминергических генов и 11 нейрональных транскрипционных факторов еще до вступления этих клеток в нейрогенез (Blondheim et al., 2006). Позже обнаружили экспрессию нестина и в МСК плаценты (Chen et al., 2008), иммунофлуоресцентное окрашивание маркера эктодермы бета-III-тубулина в МСК пуповинной крови (Zwart et al., 2008) и экспрессию этих двух маркеров в эмСК (Земелько и др., 2011). В настоящей работе путем иммунофлуоресцентного и ПЦР-анализа (рис. 3, а—в) впервые показано, что культуры МСК КМ, ЖТ и эмСК одинаково экспрессируют не только маркер ранних нейрональных предшественников нестин, но и маркер поздних нейрональных предшественников бета-III-тубулин. Таким образом, на наш взгляд, неправомерно рассматривать эти антигены в качестве маркеров нейральной индукции в МСК.

В культурах МСК из ЖТ (но не из КМ) и эмСК мы также выявили экспрессию одиночными клетками антигена промежуточных нейрональных филаментов (NF-H) (рис. 1, ЖТ г эмСК г соответственно). В другой работе авторы (Blondheim et al., 2006) показывали небольшой уровень экспрессии NF-H в недифференцированных МСК из КМ, хотя в данном исследовании мы этого не





подтвердили. Характерная фенотипическая экспрессия маркера SSEA-4 и антигенов нестина и бета-III-тубулина в цитоскелете МСК свидетельствует об их мультипотентной пластичности и предрасположенности к нейральной дифференцировке.

Для индукции нейральной дифференцировки полученных культур МСК использовали такие агенты, как 5-азациитидин (химическое соединение, вызывающее деметилирование ДНК), bFGF, EGF, SHH, FGF8, RA и IBMX, использованные нами в двух протоколах экспериментов (см. раздел «Материал и методика»). Применяя различные протоколы в зависимости от источника происхождения МСК и в пределах одного типа МСК клеток, мы оценивали эффективность нейральной индукции на основе повышения транскрипции маркерных генов и маркерных белков, таких как MAP2, GFAP, NF-H и NeuN. Кроме того, анализировали секрецию нейрально-дифференцированными МСК таких нейротрофических факторов, как BDNF (по иммунофлуоресценции), *нейротрофин-3* и *нейротрофин-4* (методом ПЦР). В качестве клеточного субстрата для дифференцировки МСК использовали матригель и ламинин.

Стимулирование нейральной дифференцировки во всех типах МСК приводило к постепенному изменению морфологии части клеток, тело у которых становилось более компактным с появлением длинных тонких отростков. Изменение морфологии с фибробластоподобной на нейральную для МСК КМ, ЖТ и эМСК отражено на рис. 2, а—в. Результаты наших исследований показали, что наиболее эффективная нейральная индукция в МСК КМ проходит без участия RA с предварительной обработкой 5-азациитидином (протокол 1) (рис. 3, а). Достаточно эффективен и протокол 2, где важным агентом дифференцировки является морфоген SHH, градиент которого играет важную роль в развитии и организации мозга эмбриона позвоночных (Johnson et al., 1994; Litingtung, Chiang, 2000; Kolpak et al., 2005). Суммарная экспрессия маркерных белков MAP2, GFAP, NF-H и NeuN в дифференцированных МСК КМ показана на рис. 2, КМ з—ж.

В отличие от МСК КМ для клеток МСК из ЖТ и эМСК, обладающих высокой пролиферативной активностью (Parker, Katz, 2006; Meng et al., 2007), RA, особенно в сочетании с 5-азациитидином, может являться дополнительным (рис. 3, б; 2, ЖТ з—ж), а для эМСК необходимым агентом нейральной индукции (рис. 2, эМСК з—и). Известно, что RA оказывает влияние на развитие центральной нервной системы и регулирует нейральную дифференцировку ЭСК (Bain et al., 1995; Chen et al., 2010). Ее действие основано на усилении транскрипции многих нейрон-специфических генов, несущих RA-респонсивный элемент в промоторе генов-мишеней. Возможно, что RA вместе с IBMX, который вызывает повышение внутриклеточного уровня цАМФ (Wang et al., 2007), играет ключевую роль в остановке пролиферации и нейральной дифференцировке эМСК.

ПЦР-анализ проанализированных генов и нейротрофических факторов выявил в недифференцированных МСК КМ и ЖТ экспрессию *MAP2* и *NT-3*. При этом индукция нейральной дифференцировки в этих клетках вызывала увеличение экспрессии *MAP-2*, но практически не меняла уровень экспрессии *NT-3* (рис. 3, а, б). Экспрессия *NT-4* отсутствовала. В отличие от МСК КМ и ЖТ нейральная индукция в культуре эМСК стимулировала экспрессию *NT-4*, особенно на ламинине в качестве подложки (рис. 3, в).

Иммуноферментный анализ культуральной среды нейрально-дифференцированных МСК для выявления синтеза фактора головного мозга BDNF свидетельствовал о том, что клетки разных типов имеют различный базальный уровень синтеза этого фактора. В культуре МСК КМ синтез BDNF не был обнаружен, МСК ЖТ в культуре экспрессировали незначительное количество BDNF, что совпадает с другими данными (Zhang et al., 2012), а эМСК экспрессировали достаточно высокое количество BDNF в контроле. Так как исходные мезенхимные клетки КМ и ЖТ не секретировали (или незначительно секретировали) BDNF, для изучения индукции BDNF анализировали среду дифференцированных МСК КМ и ЖТ, предварительно обработанных 5-азациитидином. ЭМСК, на наш взгляд, не требовали предварительного деметилирования при дифференцировке. Анализ результатов индукции секреции BDNF в процессе направленной нейральной дифференцировки показал, что все три типа МСК имеют потенциальные возможности появления или усиления секреции этого нейротрофического фактора (рис. 4). Иммунофлуоресцентный анализ влияния RA в качестве индуктора дифференцировки привел к заключению (рис. 4) о том, что присутствие RA необходимо для индукции эМСК в нейральном направлении, тогда как для индукции МСК КМ и ЖТ ее присутствие не является необходимым. Причем для усиления секреции BDNF в эМСК использование ламинина в качестве подложки было решающим.

В настоящее время проводятся активные исследования роли RA в нейральной дифференцировке стволовых клеток, в том числе и в МСК (Kim et al., 2002; Scintu et al., 2006), и данные сравнительного анализа влияния этого фактора на эффективность нейральной дифференцировки трех типов МСК представляют значительный интерес. Компоненты внеклеточного матрикса, включая ламинин, являются важными факторами индукции дифференцировки стволовых клеток, в том числе нейральной дифференцировки (Кожухарова et al., 2010; Suri, Schmidt, 2010). Однако в недавней работе (Di Summa et al., 2012) было показано, что ламинин не влияет на секрецию BDNF в МСК ЖТ. Полученные в нашем собственном исследовании разные ответы МСК из КМ, из ЖТ и эМСК на ламинин вновь иллюстрируют, что нейрогенный потенциал этих типов МСК неодинаков.

Суммируя, можно сказать, что изначально все три культуры МСК обладают мультипотентной пластич-

Рис. 2. Морфологические изменения (а—в) и экспрессия маркеров в нейрально-дифференцированных МСК из КМ, ЖТ и эМСК (з—и).

а — недифференцированные клетки; б — дифференцированные клетки; в — окраска на бета-III-тубулин; з — экспрессия белка MAP2, взаимодействующего с микротрубочками; д — экспрессия глиального кислого фибриллярного белка (GFAP); для эМСК двойное мечение; GFAP (зеленый) и ядра (DAPI голубой); е — экспрессия NF-H; ж — экспрессия белка нейрональных ядер (NeuN); з — двойная окраска на бета-III-тубулин (зеленый) и MAP2 (красный); и — двойная окраска на GFAP (зеленый) и бета-III-тубулин (красный). Фазовый контраст. Об.  $10\times$  (а, б). Масштабные отрезки: КМ — 15 (а), 25 (д, е) и 47.5 (з, ж) мкм; ЖТ — 15 (в, з), 25 (е) и 47.5 (д, ж) мкм; эМСК — 25 мкм. Использовали протоколы 1 и 2 для МСК КМ и эМСК и протокол 1 для МСК из ЖТ (см. раздел «Материал и методика»).



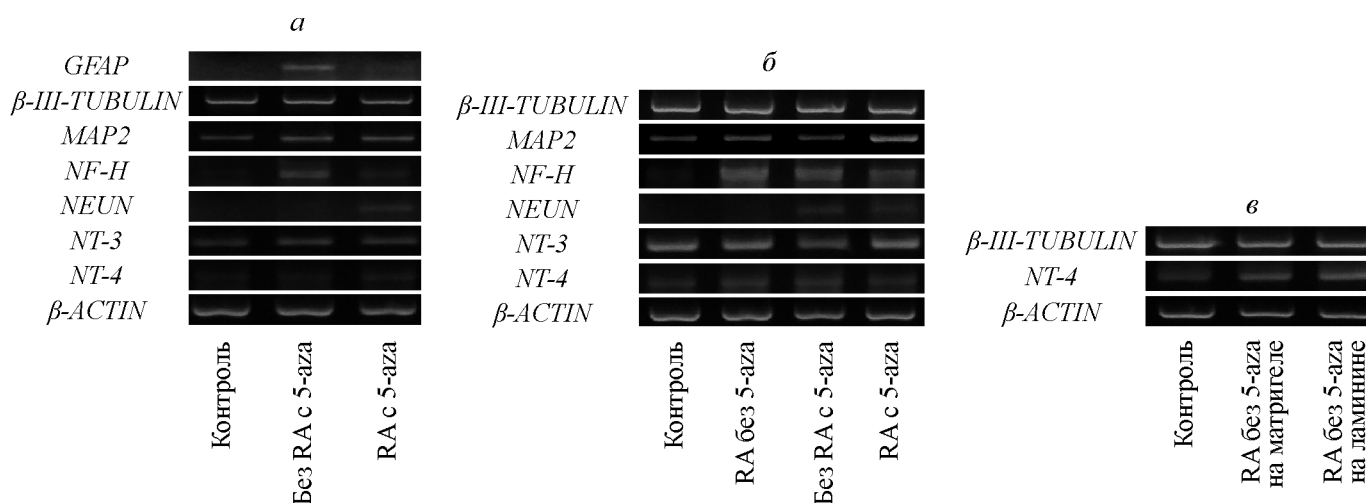


Рис. 3. Экспрессия мРНК нейральных генов в контрольных и дифференцированных МСК КМ (а), МСК ЖТ (б) и эМСК (в). Использовали протокол 1.

ностью и предрасположенностью к нейрогенезу, что выражается в экспрессии маркеров плюрипотентности SSEA-4 и нейрональных предшественников (нестина и бета-III-тубулина). Дальнейший анализ выявил наличие транскрипции маркерного гена *MAP2* и *NT-3* в недифференцированных МСК КМ и ЖТ, а в культуре эМСК — высокий базальный уровень синтеза BDNF. Стимуляция нейральной индукции такими агентами, как 5-азациитидин, bFGF, EGF, SHH, FGF8, RA и IBMX, включая компоненты внеклеточного матрикса матригель и ламинин, показала дополнительные различия в нейрогенном потенциале исследованных клеток. Так, в МСК КМ наиболее эффективная нейральная дифференцировка проходила без участия RA с предварительной обработкой клеток 5-азациитидином, а для эМСК RA являлась необходимым агентом нейральной индукции, стимулируя транскрипцию *NF-4* и усиление секреции BDNF. При этом в эМСК использование ламинина в качестве субстрата было ре-

шающим, а инкубирование клеток с 5-азациитидином необязательным.

В случае МСК ЖТ RA в сочетании с 5-азациитидином вызывала активацию экспрессии *MAP2*, что согласуется с данными литературы (Лопатина и др., 2008), но уменьшала секрецию BDNF. Таким образом, влияние RA на нейральную дифференцировку МСК ЖТ является неоднозначным и требует дальнейших исследований наряду с изучением сигнальных путей ее действия на МСК.

Наиболее распространенной гипотезой терапевтического эффекта трансплантированных МСК является паракринный механизм, согласно которому трансплантированные клетки высвобождают факторы, способствующие репарации поврежденной ткани. BDNF является одним из самых активных нейротрофинов, который поддерживает жизнеспособность существующих нейронов и способствует росту и дифференцировке новых нейронов и синапсов (Acheson et al., 1995; Zigova et al., 1998; Huang et al., 2001). Высокий базальный уровень синтеза BDNF в культуре эМСК менструальной крови наряду с высокой пролиферативной активностью и неинвазивным методом выделения этих клеток служит весомым аргументом для использования предрасположенных к нейрогенезу интактных эМСК в качестве субстрата клеточной терапии для восстановления нервной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения и социального развития РФ (Госконтракт № К-32-НИР/111-3) в рамках программы Союзного государства «Стволовые клетки».

#### Список литературы

Анисимов С. В. 2009. Клеточная терапия болезни Паркинсона: IV. Риски и перспективы. Успехи геронтол. 22 (3): 418—439.

Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичева Н. К., Корсаков В. С., Никольский Н. Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия: выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 53 (12): 919—929.

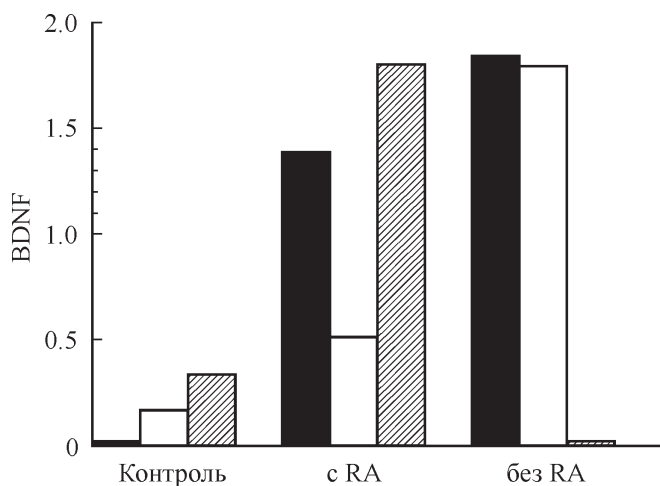


Рис. 4. Секреция нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в дифференцированных МСК КМ (черные столбцы), МСК ЖТ (серые столбцы) и эМСК (заштрихованные столбцы).

По вертикали: относительное количество BDNF, пг на 1 мкг РНК. Использовали протокол 1.

- Кожухарова И. В., Фридлянская И. И., Земелько В. И., Ковалева З. В., Пузовкина Н. А., Алексеенко Л. Л., Харченко М. В., Аксенов Н. Д., Шатрова А. Н., Гринчук Т. М., Анисимов С. В., Никольский Н. Н. 2010. Получение дофаминовых нейронов из эмбриональных стволовых клеток человека *in vitro*. Цитология. 52 (10) : 875—883.
- Лопатина Т. В., Калинин Н. И., Ревущин А. В., Беме А. А., Спирина И. А., Павлова Г. В., Парфенова Е. В. 2008. Индукция нейральной дифференцировки стромальных клеток жировой ткани. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 3 (4) : 50—55.
- Acheson A., Conover J. C., Fandl J. P., DeChiara T. M., Russell M., Thadani A., Squinto S. P., Yancopoulos G. D., Lindsay R. M. 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*. 374 : 450—453.
- Bain G., Kitchens D., Yao M., Huettner J. E., Gottlieb D. I. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Development*. 168 : 342—357.
- Blondheim N. R., Levy Y. S., Ben-Zur T., Burshtein A., Chertlow T., Kan I., Barzilai R., Bahat-Stromza M., Barhum Y., Bulvik S., Melamed E., Offen D. 2006. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Development*. 15 : 141—164.
- Borlongan C. V., Kaneko Y., Maki M., Yu S. J., Ali M., Allickson J. G., Sanberg C. D., Kuzmin-Nichols N., Sanberg P. R. 2010. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Development*. 19 : 439—452.
- Buhring H. J., Battula V. L. 2007. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106 : 262—271.
- Chen C. W., Liu C. S., Chiu I. M., Shen S. C., Pan H. C., Lee K. H., Lin S. Z., Su H. L. 2010. The signals of FGFs on the neurogenesis of embryonic stem cells. *J. Biomed. Sci.* 17 : 33.
- Chen I., He D. M., Zhang Y. 2009. The differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic cells *in vitro*. *Cell Mol. Biol. Lett.* 14 : 528—536.
- Da Silva 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.
- Di Summa P. G., Kalbermatten D. F., Raffoul W., Terenghi G., Kingham P. J. 2012. Extracellular matrix molecules enhance the neurotrophic effect of Schwann cell-like differentiated adipose-derived stem cells and increase cell survival under stress conditions. *Tissue Eng. Part A* : 24.
- Dmitrieva R. I., Minullina I. R., Bilibina A. A., Tarasova O. V., Anisimov S. V., Zaritsky A. Y. 2012. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle*. 11 : 377—383.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D. et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 8 : 315—317.
- Gang E. J., Bosnakovski D., Figueiredo C. A., Visser J. W., Perlingeiro R. C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 109 : 1743—1751.
- Gargett C. E., Masuda H. 2010. Adult stem cells in the endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 16 : 818—834.
- Huang E. J., Reichardt L. F. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24 : 677—736.
- Husein K. S., Thiemermann C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 28 : 585—596.
- Jang S., Cho H. H., Cho Y. B., Park J. S., Jeong H. S. 2010. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol.* 16 : 11—25.
- Johnson R. L., Riddle R. D., Laufner E., Tabin C. 1994. Sonic hedgehog: a key mediator of anterior-posterior patterning of the limb and dorso-ventral patterning of axial embryonic structures. *Biochem. Soc. Trans.* 22 : 569—574.
- Jori F. P., Napolitano M. A., Melone M. A., Cipollaro M., Cascino A., Altucci L., Peluso G., Giordano A., Galderisi U. 2005. Molecular pathways involved in neural *in vitro* differentiation of marrow stromal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 94 : 645—655.
- Kang S. K., Lee D. H., Bae Y. C., Kim H. K., Baik S. Y., Jung J. S. 2003. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 183 : 355—366.
- Kim B., Seo J. H., Bubien J. K., Oh Y. S. 2002. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells *in vitro*. *Neuroreport*. 13 : 1185—1188.
- Kolpak A., Zhang J., Bao Z. Z. 2005. Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J. Neurosci.* 25 : 3432—3441.
- Lee T. H., Yoon J. G., 2008. Intracerebral transplantation of human adipose tissue stromal cells after middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Clin. Neurosci.* 15 (8) : 907—912.
- Litingtung Y., Chiang C. 2000. Control of Shh activity and signaling in the neural tube. *Development*. 127 : 143—154.
- Long X., Olszewski M., Huang W., Kletzel M. 2005. Neural cell differentiation *in vitro* from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Development*. 14 : 65—69.
- Meng X., Ichim T. E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thébaud B., Riordan N. H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J. Transl. Med.* 5 : 57—66.
- Molero A. E., Gokhan S., Gonzalez S., Feig J. L., Alexandre L. C., Mehler M. F. 2009. Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 106 : 21 900—21 905.
- Murphy M. P., Wang H., Patel A. N., Kambhampati S., Angelle N., Chan K., Marleau A. M., Pysznik A., Carrier E., Ichim T. E. et al. 2008. Allogeneic endometrial regenerative cells: an «Off the shelf solution» for critical limb ischemia? *J. Transl. Med.* 6 : 45—52.
- Parker A. M., Katz A. J. 2006. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 6 : 567—578.
- Patel A. N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F. J., Allickson J. G. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant.* 17 : 303—311.
- 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.
- Prockop D. 2009. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol. Ther.* 17 : 939—946.
- Riekstina U., Cakstina I., Parfejevs V., Hoogduijn M., Jankovskis G., Muiznieks I., Muceniece R., Ancans J. 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* 5 : 378—386.
- Schraufstatter I. U., Discipio R. G., Khaldoyanidi S. 2011. Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Front. Biosci.* 17 : 2271—2288.
- Scintu F., Reali C., Pillai R., Badiali M., Sanna M. A., Argioli F., Ristaldi M. S., Sogos V. 2006. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci.* 16 : 7—14.
- Suri S., Schmidt C. E. 2010. Cell-laden hydrogel constructs of hyaluronic acid, collagen, and laminin for neural tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*. 16 : 1703—1716.
- Thornell L. E., Lindstrom M., Renault V., Klein A., Mouly V., Ansved T., Butler-Browne G., Furling D. 2009. Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 35 : 603—613.
- Trzaska K. A., Kuzhikandathil E. V., Ramashwar P. 2007. Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 25 : 2797—2808.

Wang T. T., Tio M., Lee W., Beerheide W., Udolph G. 2007. Neural differentiation of mesenchymal-like stem cells from cord blood is mediated by PKA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 : 1021—1027.

Woodbury D., Reynolds A., Black I. B. 2002. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 96 : 908—917.

Zhang H. T., Liu Z. L., Yao X. Q., Yang Z. J., Xu R. X. 2012. Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Cytotherapy.* 14 : 1203—1214.

Zigova T., Pencea V., Wiegand S. J., Luskin M. B. 1998. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol. Cell. Neurosci.* 11 : 234—245.

Zwart I., Hill A. J., Girdlestone J., Manca M. F., Navarrete R., Navarrete C., Jen L. S. 2008. Analysis of neural potential of human umbilical cord blood-derived multipotent mesenchymal stem cells in response to a range of neurogenic stimuli. *J. Neurosci. Res.* 86 : 1902—1915.

Поступила 19 X 2012

NEUROGENIC POTENTIAL OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS ISOLATED FROM BONE MARROW, ADIPOSE TISSUE AND ENDOMETRIUM: A COMPARATIVE STUDY

V. I. Zemelko,<sup>1</sup> I. B. Kozhucharova,<sup>1,2</sup> L. L. Alekseenko,<sup>1</sup> A. P. Domnina,<sup>1</sup> G. F. Reshetnikova,<sup>1,2</sup> M. V. Puzanov,<sup>2</sup> R. I. Dmitrieva,<sup>2</sup> T. M. Grinchuk,<sup>1,2</sup> N. N. Nikolsky,<sup>1</sup> S. V. Anisimov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS and <sup>2</sup> V. A. Almazov Federal Center for Heart, Blood and Endocrinology, St. Petersburg;  
e-mail: vzelmelko@mail.ru

Mesenchymal stem cells (MSCs) can be isolated from many adult tissue sources. These cells are a valuable substrate in cell therapy for many diseases and injuries. Different types of MSCs vary in plasticity. We performed a comparative study of the neurogenic potential of three types of human MSCs derived from bone marrow (BMSCs), subcutaneous adipose tissue (ADSCs) and endometrium (isolated from the menstrual blood) (eMSCs). It was shown that all three types of MSC cultures demonstrate multipotent plasticity and predisposition to neurogenesis, based on the expression of pluripotency markers SSEA-4 and neuronal precursors' markers nestin and beta-III-tubulin. Further analysis revealed the transcription of the neuronal marker MAP2 and neurotrophin-3 in undifferentiated BMSCs and ADSCs. Additionally, a significant basal level of synthesis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in eMSC culture was also observed. Stimulation of neural induction with such agents as 5-azacytidine, recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), recombinant human epidermal growth factor (EGF), a recombinant human fibroblast growth factor 8 (FGF8), morphogen SHH (sonic hedgehog), retinoic acid (RA) and isobutyl-methyl-xanthine (IBMX), showed further differences in the neurogenic potential of the MSCs. The components of the extracellular matrix, such as Matrigel and laminin, were also the important inducers of differentiation. The most effective neural induction in BMSCs proceeded without the RA participation while the cells pretreated with 5-azacytidine. In contrary, in the case of eMSCs RA was a necessary agent of neural differentiation as it stimulated the transcription of neurotrophin-4 and the elevation of secretion level of BDNF. The use of laminin as the substrate in eMSCs appeared to be critical, though an incubation of the cells with 5-azacytidine was optional. As far as ADSCs, RA in combination with 5-azacytidine caused the elevation of expression of MAP2, but reduced the secretion of BDNF. Thus, the effect of RA on neural differentiation of ADSCs is ambiguous and, together with the study of its signaling pathways in the MSCs, requires further research. The therapeutic effect of transplanted MSCs is commonly explained by their paracrine activity. The high basal level of BDNF synthesis in the eMSCs, along with their high proliferative rate, non-invasive extraction and neural predisposition, is a powerful argument for the use of the intact eMSCs as a substrate in cell therapy to repair nerve tissue.

Key words: cell therapy, mesenchymal stem cells.