

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПОДКОЖНОЙ И СУБЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

© Т. А. Крылова,¹ О. А. Быстрова,¹ А. А. Худяков,^{1, 2} А. Б. Малашичева,^{2, 3}
О. М. Мусеева,² В. В. Зенин,¹ М. Г. Мартынова¹

¹ Институт цитологии РАН, ² Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, и ³ кафедра эмбриологии С.-Петербургского государственного университета; электронный адрес: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

Стволовые клетки (СК) значительно варьируют по морфологическим, иммунофенотипическим, пролиферативным характеристикам и способности к дифференцировке в зависимости от своего тканевого происхождения. Сравнительный анализ их биологических свойств существен для оптимального выбора СК в регенеративной терапии. Методами иммуноцитохимии, проточной цитометрии, гистохимии и ОТ-ПЦР мы исследовали СК, полученные из субэпикардиальной жировой ткани (СЭК-ЖТ) и подкожной жировой ткани (ПК-ЖТ) человека при их культивировании в одинаковых условиях без применения факторов, стимулирующих дифференцировку. Культуры оказались сходными по высокому содержанию PCNA-положительных клеток. В обеих культурах иммунофенотипирование выявило высокую долю клеток, экспрессирующих маркеры мезенхимных СК, CD29, CD44, CD73 и CD105, низкую долю клеток, экспрессирующих CD31, CD34 и CD45, и широкую вариабельность количества клеток, экспрессирующих CD117, CD146 и CD309. Единственным различием в CD-портрете было значительно более низкое содержание клеток с экспрессией CD90 в культуре СЭК-ЖТ. Гистохимический анализ показал отсутствие клеток, окрашиваемых масляным красным (тест на адипоцитарную дифференцировку), в обеих культурах и в 10 раз большее количество клеток, реагирующих со щелочной фосфатазой (тест на остеоцитарную дифференцировку), в культуре ПК-ЖТ. Иммуноцитохимическое тестирование выявило одинаково низкое количество клеток, экспрессирующих маркер тяжелой цепи миозина MAB1628 и гладкомышечного α -актина α -hSMA в обеих культурах. Доля клеток, экспрессирующих белок щелевых контактов коннексин-43, была значительно выше в культуре, полученной из ПК-ЖТ. Клетки только этой культуры экспрессировали маркер эпителиальных клеток цитокератин-19. Методом ОТ-ПЦР в СК из СЭК-ЖТ была обнаружена мРНК гена *GATA4*. Таким образом, культура ПК-ЖТ богаче предшественниками эпителиальных и остеогенных клеток, тогда как культура СЭК-ЖТ содержит кардиомиогенные СК и может рассматриваться как альтернатива ПК-ЖТ в качестве источника СК для кардиотерапии.

Ключевые слова: иммуноцитохимия, иммунофенотипирование, ОТ-ПЦР, *GATA4*.

Принятые сокращения: ЖТ — жировая ткань, СК — стволовые клетки, СЭК-ЖТ — субэпикардиальная ЖТ, ПК-ЖТ — подкожная ЖТ.

Трансплантация стволовых клеток (СК) зарекомендовала себя как перспективный метод в регенеративной терапии многих заболеваний (см. обзор: Dimarino et al., 2013). Все ткани и органы содержат СК, участвующие в их физиологическом обновлении, и могут служить источником для их изоляции и культивирования. Полученные из разных тканей СК различаются по ряду характеристик, в том числе по способности дифференцироваться в тот или иной функциональный тип (Jansen et al., 2010). Так, были показаны различия мезенхимных СК разного тканевого происхождения по адипогенному, остеогенному (Musina et al., 2006), гепатогенному (Taléns-Visconti et al., 2006) и нейрогенному (Земелько и др., 2013) потенциалам. В настоящее время широко проводятся сравнительные исследования биологических характеристик СК, изолированных из разных тканей, в целях выбора СК, наиболее

адекватных для клеточной терапии конкретных заболеваний.

В связи с тем что сердечно-сосудистые заболевания сохраняют лидирующее положение в списке причин смерти, большой интерес представляет разработка биомедицинских методов их лечения с применением СК (Dinsmore, Dib, 2008). Возможности и перспективы этих методов широко изучаются и обсуждаются, однако исследователи еще далеки от окончательных практических рекомендаций (Gnecchi et al., 2012; Przybyl, Harmsen, 2013). Популярным источником СК является подкожная жировая ткань (ПК-ЖТ) ввиду легкой доступности ее большой массы при процедурах липоаспирации и получения СК в терапевтически значимых количествах. Показано, что СК, изолированные из ПК-ЖТ, обладают характеристиками мезенхимных СК и способностью к диффе-

ренцировке в различных направлениях (Zuk et al., 2002; Zhu et al., 2008).

Ткани сердца также привлекают внимание в качестве источника СК для лечения сердечных патологий. Получены положительные результаты применения СК, изолированных из биопсийных образцов межжелудочковой перегородки сердца (Barile et al., 2007), правого ушка предсердия (Chugh et al., 2012) и неонатального сердца (Simpson et al., 2012). Недавно было показано, что субэпикардальная жировая ткань (СЭК-ЖТ) содержит СК (Bayes-Genis et al., 2010, 2013; Krylova et al., 2011). По своим морфологическим, биохимическим и физиологическим свойствам сердечная ЖТ отличается от ЖТ другой локализации. Отличия касаются размеров адипоцитов, содержания жирных кислот и белков, скорости метаболизма и др. (Rabkin, 2006). Это позволяет предположить, что СЭК-ЖТ в качестве ниши для СК создает особые условия, определяющие специфические свойства резидентных СК.

Целью настоящей работы было сравнительное изучение иммунофенотипических, иммуноцитохимических и молекулярных характеристик СК, полученных из СЭК-ЖТ и ПК-ЖТ, при культивировании в одинаковых условиях. Чтобы проанализировать клетки в состоянии, наиболее приближенном к нативному, культивирование проводили без применения индукторов направленной дифференцировки, а тестировали культуры на ранних пассажах.

Материал и методика

Получение и ведение клеточных культур. Стволовые клетки (СК) получали из двух тканевых источников — СЭК-ЖТ и ПК-ЖТ человека. Образцы ЖТ брали во время хирургической операции коронарного шунтирования от пациентов 40—50 лет. Процедуру проводили в соответствии с Хельсинской декларацией при разрешении госпитальной комиссии по этике. Биопсии из СЭК-ЖТ в области атриовентрикулярной борозды левого сердца брали при помощи ножиц до подключения аппарата искусственного кровообращения. Одновременно брали биопсии из ПК-ЖТ в районе вскрытия грудной клетки. Образцы тканей в течение 1 ч транспортировали в лабораторию в бессывороточной среде DMEM (GIBCO, США), содержащей 50 мг/мл гентамицина (Sigma, США). После многократной промывки в растворе PBS, не содержащем кальция и магния, образцы механически измельчали и диссоциировали в растворе 0.1 %-ной коллагеназы I (GIBCO, США) при 37 °C в течение 40 мин с использованием шейкера. Затем активность фермента нейтрализовали фетальной бычьей сывороткой (FBS) (HyClone, США). Клеточную суспензию центрифугировали при 900 g в течение 7 мин, полученный ступок ресуспендировали в ростовой среде α MEM (Sigma, США), содержащей 10 % FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 2 мМ глутамина (все от GIBCO, США), фильтровали через нейлоновый фильтр с порами 100 мкм и центрифугировали еще 1 раз. Затем клетки высевали с плотностью $3 \cdot 10^4$ кл./см² и культивировали в чашках Петри или культуральных флаконах при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Через 48 ч клетки начинали прикрепляться ко дну культуральных сосудов. Среду меняли дважды в неделю. В экспериментах использовали клетки 3—5 пассажей на 3-и сут после

посева. При культивировании не использовали индукторы направленной дифференцировки.

Иммунофенотипический анализ. Иммунофенотипирование проводили по стандартной методике (Dominici et al., 2006). Клетки на 3—5-й пассаже ресуспендировали и инкубировали 30 мин в темноте при 4 °C в PBS, содержащем антитела, конъюгированные с FITC (флуоресценцизиотиоционатом) или PE (фикоэритрином), к маркерам CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD117, CD146 и CD309. Все антитела были получены от Becton-Dickinson Biosciences (США). После очередного ресуспендирования в 1 мл PBS, содержащего 2 мМ EDTA, тестировали распределение клеток по содержанию маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии на приборах Epics XL (Beckman Coulter, США) и BD FACS Calibur. Полученные данные анализировали, используя программу CELLQuest (Becton Dickinson).

Иммуноцитохимический анализ. Использовали стандартный иммуноцитохимический протокол. Клетки на покровных стеклах фиксировали 4%-ным параформальдегидом при комнатной температуре в течение 15 мин, трижды промывали в PBS по 5 мин и затем обрабатывали 0.1%-ным Тритоном X-100 в течение 10 мин для увеличения проницаемости клеточных мембран. Клетки еще 3 раза по 5 мин промывали в PBS, содержащем 0.2 % Tween 20, 10 мин инкубировали в 3%-ной H₂O₂ для блокировки эндогенной пероксидазы и 20 мин в 10%-ной FBS (Sigma, США) для блокировки неспецифического связывания антител. С первыми антителами клетки инкубировали в течение 1 сут при 4 °C.

Использовали следующие антитела: моноклональные антитела к гладкомышечному актину человека α -hSMA (разведение 1 : 200) и цитокератину-19 (разведение 1 : 100) (Dako, Дания), моноклональные антитела к миозину медленной мышцы MAB 1628 (разведение 1 : 50, Millipore и США) и поликлональные антитела к коннексину-43 (разведение 1 : 100; Millipore, США).

После промывки в PBS клетки 20 мин при комнатной температуре инкубировали со вторыми антителами. Использовали смесь биотинилированных антимиоциновых и антикродлических антител (DAKO, Дания). Затем клетки 20 мин обрабатывали extrAvidin-peroxidase (разведение 1 : 400; Sigma) и окрашивали в течение 3 мин DAB + chromogen; DAKO (Дания) и гематоксилином. Контрольная процедура, проводимая без применения первых антител, показала отсутствие неспецифического окрашивания.

Долю иммуноцитохимически меченных клеток определяли путем подсчета на случайных полях препарата. Для каждого антитела анализировали по 1000 клеток в каждом из образцов обеих культур. Количество образцов (n) для культур СЭК-ЖТ и ПК-ЖТ соответствовало количеству пациентов, от которых был получен биопсийный материал. Данные представлены в виде средних значений и их ошибки.

Пролиферативную активность оценивали методом иммуноокрашивания, используя моноклональные антитела к антигену ядер пролиферирующих клеток (anti-PCNA, разведение 1 : 1000; Sigma, США). Подсчитывали количество PCNA-положительных клеток на 1000 клеток в каждом образце.

Гистохимический анализ. Для выявления адипоцитарной дифференцировки клетки фиксировали 2 мин в абсолютном метаноле при –20 °C и окрашивали свежеприготовленным 0.5%-ным раствором масляного красно-

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованных для амплификации маркеров

| Ген | Направление праймера | Последовательность (5'—3') |
|-------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>Oct 3/4</i> | Прямой | GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG |
| | Обратный | CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC |
| <i>GATA 4</i> | Прямой | GACGGGTCACTATCTGTGCAAC |
| | Обратный | AGACATCGCACTGACTGAGAAC |
| <i>Тропонин Т</i> | Прямой | GGCAGCGGAAGAGGATGCTGAA |
| | Обратный | GAGGCACCAAGTTGGGCATGAACGA |
| <i>NKX 2.5</i> | Прямой | GGCCTCAATCCCTACGGTTA |
| | Обратный | CACGAGAGTCAGGGAGCTGT |

го (Oil Red-O) в изопропанол в течение 10 мин для визуализации липидных включений.

Для гистохимического выявления щелочной фосфатазы клетки фиксировали 4%-ным формалином в течение 1 ч при комнатной температуре, 3 раза промывали раствором PBS, не содержащем кальция и магния, и обрабатывали коммерческой смесью BCIP-NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt and nitroblue tetrazolium chloride mix substrate; Sigma, США) в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Затем клетки промывали и высушивали. Щелочную фосфатазу выявляли визуально по темноокрашенному продукту реакции. Число окрашенных клеток определяли на 1000 клеток для каждого образца.

Анализ экспрессии маркеров методом ОТ-ПЦР. Из клеток выделяли тотальную РНК, используя TRIzol(r)Reagent (Invitrogen, США), согласно рекомендациям фирмы-производителя. Качество РНК оценивали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле в буфере TAE (2 М трис-основания, 1.56 М ледяной уксусной кислоты и 0.05 М ЭДТА, pH 8.0). В реакции обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК. Обратную транскрипцию осуществляли при помощи RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для анализа экспрессии генов-маркеров раннего кардиомиогенеза *GATA4* и *Nkx2.5*, гена-маркера дифференцированных кардиомиоцитов *тропонина Т* и гена «стволовости» *Oct3/4* проводили амплификацию кДНК, используя праймеры, указанные в табл. 1. Параллельно проводили контрольную амплификацию кДНК гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*). ПЦР проводили согласно рекомендациям фирмы-изготовителя реактивов и фермента Таq-полимеразы (Силекс, Россия). Реакционная смесь (50 мкл) состояла из 10 нг кДНК-матрицы, полученной после реакции обратной транскрипции, 10-кратного буфера для ПЦР, 0.2 мМ дезоксирибонуклеотидов, по 400 нМ прямого и обратного праймеров, деионизированной воды и 1 ед. полимеразы Таq. Амплификацию вели по следующей схеме: 95 °С — 30 с, затем 35 циклов (95 °С — 30 с, 58—64 °С — 30 с, 72 °С — 45 с) и 72 °С — 7 мин. Температуру отжига праймеров определяли при помощи онлайн-сервиса OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

ПЦР осуществляли в ДНК-амплификаторе (Applied Biosystems, США). Продукт ПЦР электрофоретически разделяли в 1.5%-ном агарозном геле. Специфическую полосу определяли по молекулярной массе, сравнивая с

маркером ДНК размером 100 п. о. (Сибэнзим, Россия). Гель фотографировали с помощью системы гель-документирования (ChemiDoc XRS, Bio-Rad, США). В качестве контроля использовали также культуру мезенхимных СК (Крылова и др., 2012) и кДНК миокарда.

Результаты

Результаты иммунофенотипирования клеток методом проточной цитофлуориметрии в культурах СЭК-ЖТ и ПК-ЖТ представлены на рис. 1. В клетках обеих культур обнаружены сходная высокая доля клеток (>90 %), экспрессирующих поверхностные маркеры CD29, CD44, CD73 и CD105, и низкая доля клеток (<20 %), экспрессирующих CD31, CD34 и CD45. В образцах обеих культур обнаружена большая вариабельность доли клеток, экспрессирующих CD117, CD146 и CD309. Культуры различались по количеству клеток, экспрессирующих CD90. Доля клеток, экспрессирующих этот маркер, во всех образцах культуры ПК-ЖТ была выше 95 %, тогда как в образцах культуры СЭК-ЖТ она варьировала от 13 до 95 % и в среднем составляла около 50 %.

Пролиферативную активность клеток анализировали методом PCNA-иммуноокрашивания. Доля пролиферирующих СК в культурах СЭК-ЖТ и ПК-ЖТ составила 91.7 ± 2.9 и 83.3 ± 7.3 % соответственно.

Результаты иммуноцитохимического тестирования представлены в табл. 2. Образцы обеих культур обладали сходным низким содержанием клеток с экспрессией маркеров тяжелой цепи миозина MAB1628 и гладкомышечного α -актина α -hSMA. Доля клеток, демонстрирующих экспрессию белка щелевых контактов коннексина-43, была выше в культуре ПК-ЖТ, и только в клетках этой культуры обнаружена экспрессия маркера эпителиальных клеток цитокератина-19. Гистохимическая реакция на щелочную фосфатазу выявила 2.2 ± 1.4 % прореагировавших клеток в культуре СЭК-ЖТ и 22.0 ± 5.7 % таких клеток в культуре ПК-ЖТ.

Гистохимическое окрашивание масляным красным показало отсутствие адипоцитов в обеих культурах.

Методом ОТ-ПЦР ни в одном из образцов обеих культур не было выявлено экспрессии гена эмбриональных СК *Oct3/4*, гена ранних сердечных прогениторных клеток *Nkx2.5* и гена-маркера дифференцированных кардиомиоцитов *тропонина Т*. В образцах СК из СЭК-ЖТ был обнаружен высокий уровень экспрессии гена *GATA4* (рис. 2).

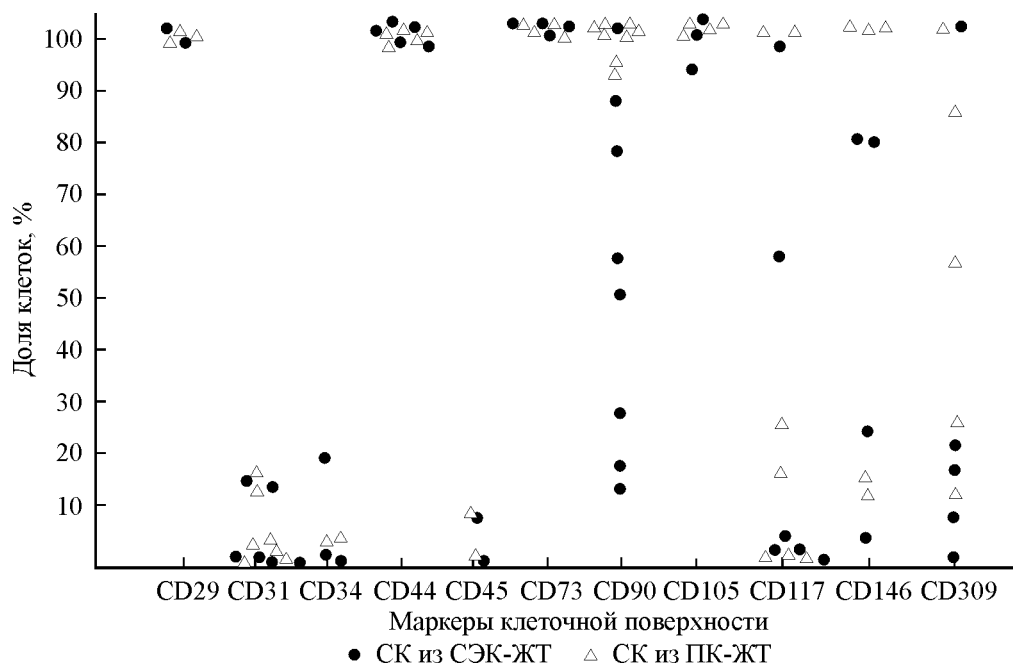


Рис. 1. Сравнительный анализ экспрессии поверхностных маркерных антигенов в культурах стволовых клеток (СК), изолированных из субэпикардиальной жировой ткани (СЭК-ЖТ) и подкожной жировой ткани (ПК-ЖТ).

Каждая точка — результат замера для 1 образца культур.

Обсуждение

В настоящей работе проведен анализ СК, полученных из жировой ткани человека различной локализации, методами проточной цитофлуориметрии, иммуноцитохимии, гистохимии и ПЦР-РТ.

Имунофенотипический портрет двух культур весьма сходен. Обе культуры демонстрируют стабильно высокое содержание клеток, экспрессирующих маркеры CD29, CD44, CD73 и CD105, что характерно для мезенхимных стволовых клеток (Dominici et al., 2006), и низкое содержание клеток, экспрессирующих маркеры эндотелиальных клеток CD31 и маркеры кроветворных прогениторных клеток CD34 и CD45. По количеству клеток, экспрессирующих такие поверхностные маркеры, как CD117 (маркер стволовости), CD146 (маркер мультифункциональных молекул, связанных с клеточной дифференциацией, миграцией, ангиогенезом и другими процессами) и CD309 (маркер рецептора васкулярного эндотелиального фактора роста), обе протестированные культуры демонстрируют широкую вариабельность, которая может быть связана с зависимостью степени экс-

прессии этих антигенов от плотности посева, пассирования и других параметров культивирования. Выявленные различия между культурами были выявлены только по экспрессии CD90 (молекулы клеточной адгезии Thy-1), которая в СК из СЭК-ЖТ была значительно ниже. Новейшие данные показали, что высокий уровень экспрессии этого маркера характерен для раковых СК (Lobba et al., 2012; Jia et al., 2013; Schubert et al., 2013; Yan et al., 2013). Можно предположить, что низкий уровень экспрессии

Таблица 2

Экспрессия маркерных белков в культурах СК, изолированных из СЭК-ЖТ и ПК-ЖТ

| Антитела | Доля СК, связавших антитела, % | |
|----------------|--------------------------------|--------------|
| | СЭК-ЖТ | ПК-ЖТ |
| MAV 1628 | 0.85 ± 0.57 | 3.12 ± 1.39 |
| Alpha-hSMA | 5.00 ± 2.17 | 7.25 ± 3.54 |
| Коннексин-43 | 7.50 ± 2.25 | 20.50 ± 1.12 |
| Цитокератин-19 | 0 | 1.17 ± 0.17 |

Примечание. Даны средние значения и их ошибки, n = 4.

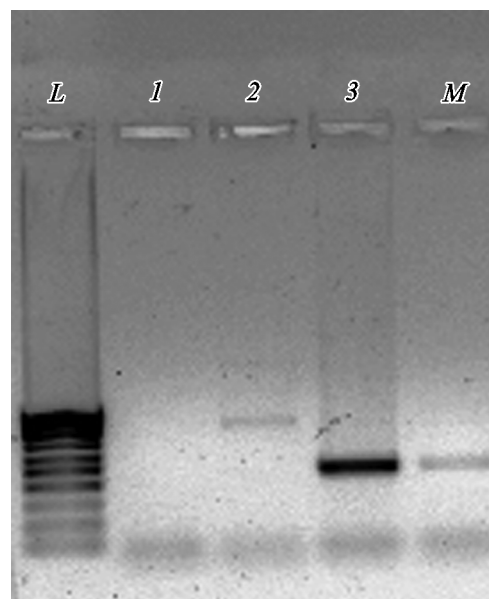


Рис. 2. Экспрессия мРНК гена *GATA4* в СК, изолированных из СЭК-ЖТ и ПК-ЖТ.

Дорожки: L — маркерная ДНК (100 п. о.), 1 — мезенхимные СК, 2 — СК из ПК-ЖТ, 3 — СК из СЭК-ЖТ, M — кДНК миокарда.

CD90 отражает пониженную способность резидентных СК сердца образовывать опухоли. В пользу такого предположения свидетельствует и выявленная нами низкая экспрессия коннексина-43 в культивируемых СК из СЭК-ЖТ по сравнению с СК из ПК-ЖТ. Имеются данные о снижении уровня или отсутствии этого белка, участвующего в формировании межклеточных контактов, в раковых клеточных линиях (Salameh, Dhein 2005; Spath et al., 2013). Не исключено, что с этими факторами связана известная редкость возникновения первичных опухолей сердца (Rica, Reardon, 2010).

Тестирование СК методом ОТ-ПЦР не выявило экспрессии гена *тропонина Т* ни в одном из образцов обеих культур. Коннексин-43 и *тропонин Т* используются в качестве маркеров кардиомиогенной дифференциации; первый из этих белков связан с формированием контактов между кардиомиоцитами и началом их сокращений, а второй — с развитием сократительного аппарата клетки. Их экспрессия характерна для терминально дифференцированных кардиомиоцитов, и ее повышение в культивируемых мезенхимных СК обнаруживают только после воздействия индукторами направленной кардиодифференцировки (Ishimine et al., 2013). В нашем исследовании при культивировании клеток без применения индуцирующих факторов и на ранних пассажах не было выявлено выраженной спонтанной кардиомиогенной дифференцировки СК, полученных из СЭК-ЖТ. Большое количество клеток с экспрессией белка межклеточных контактов коннексина-43 в культурах ПК-ЖТ, возможно, связано с их эпителиально-клеточным потенциалом, который подтверждается выявлением в этих клетках цитокератина-19, который рассматривают в качестве эпителиального маркера (Michel et al., 1996).

В образцах обеих культур не было обнаружено экспрессии гена эмбриональных стволовых клеток *Oct3/4*. Снижение транскрипции *Oct3/4* связывают с утерей клетками плюрипотентности. Отсутствие экспрессии данного гена в клетках анализируемых нами культур можно интерпретировать как некоторую их коммитированность на дифференцировку в определенных направлениях.

Тестирование клеток обеих культур методом ОТ-ПЦР не выявило экспрессии гена раннего кардиоге-неза *Nkx 2.5*. Однако в образцах СК из СЭК-ЖТ была обнаружена экспрессия гена *GATA4* — другого гена раннего кардиоге-неза. Экспрессию транскрипционного фактора *GATA4* рассматривают как наиболее ранний признак кардиоге-неза. Полученные данные показали, что уже исходные СК из СЭК-ЖТ, не получившие индуцирующего сигнала, могут быть коммитированы на кардиомиогенную дифференцировку.

Итак, полученные данные показали, что СК, изолированные из СЭК-ЖТ и ПК-ЖТ на ранних пассажах культивирования без воздействия индукторов дифференцировки, находясь в близком к нативному состоянию, во многом сходны по экспрессии поверхностных белковых маркеров и другим характеристикам. Однако выявлены и некоторые особенности СК из СЭК-ЖТ; они включают в себя пониженную экспрессию коннексина-43, слабую реактивность со щелочной фосфатазой, отсутствие экспрессии цитокератина-19 и экспрессию мРНК гена *GATA4*. Эти результаты свидетельствуют о сниженном потенциале эпителиальной и остеогенной дифференцировки и повышенном потенциале кардиомиогенной дифференцировки у СК, изолированных из СЭК-ЖТ, по сравнению с СК, изолированными из ПК-ЖТ. Дальнейшие исследова-

ния, в частности сравнительный анализ воздействия на СК разного происхождения индукторов направленной дифференцировки, необходимы для более полной оценки кардиомиогенного потенциала СК, локализованных в СЭК-ЖТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций» и «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Земелько В. И., Кожухарова И. В., Алексеев Л. Л., Домнина А. П., Решетникова Г. Ф., Пузанов М. В., Дмитриева Р. А., Гринчук Т. М., Никольский Н. Н., Анисимов С. В. 2013. Сравнительный анализ нейрогенного потенциала мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга, жировой ткани и эндометрия. Цитология. 55 (2) : 101—110. (Zemelko V. I., Kozhukharova I. B., Alekseenko L. L., Domnina A. P., Reshetnikova G. F., Puzanov M. V., Dmitrieva R. I., Grinchuk T. M., Nikolsky N. N., Anisimov S. V. 2013. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study. Cell Tissue Biol. 7 : 235—244.)
- Крылова Т. А., Кольцова А. М., Зенин В. В., Музорова А. С., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. 54 (1) : 5—16. (Krylova T. A., Koltsova A. M., Zenin V. V., Musorina A. S., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2012. Comparative characteristics of new lines of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells, bone marrow, and foreskin. Cell Tissue Biol. 6 : 95—107.)
- Barile L., Messina E., Giacomello A., Marban E. 2007. Endogenous cardiac stem cells. Prog. Cardiovasc. Dis. 50 : 31—48.
- Bayes-Genis A., Gálvez-Montón C., Prat-Vidal C., Soler-Botija C. 2013. Cardiac adipose tissue: a new frontier for cardiac regeneration? Int. J. Cardiol. 167 : 22—25.
- Bayes-Genis A., Soler-Botija C., Farré J., Sepúlveda P., Raya A., Roura S., Prat-Vidal C., Gálvez-Montón C., Montoro J. A., Büscher D., Izpisua Belmonte J. C. 2010. Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. J. Mol. Cell. Cardiol. 49 : 771—780.
- Chugh A. R., Beache G. M., Loughran J. H., Newton N., Elmore J. B., Kajstura J., Pappas P., Tatoes A., Stoddard M. F., Lima J. A., Slaughter M. S., Anversa P., Bolli R. 2012. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. Circulation. 126 (11 Suppl. 1) : S54—S64.
- Dimarino A. M., Caplan A. I., Bonfield T. L. 2013. Mesenchymal stem cells in tissue repair. Front Immunol. 4 : 201—209.
- Dinsmore J. H., Dib N. 2008. Stem cells and cardiac repair: a critical analysis. J. Cardiovasc. Transl. Res. 1 : 41—54.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 8 : 315—317.
- Gnecchi M., Danielli P., Cervio E. 2012. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. Vascul. Pharmacol. 57 : 48—55.
- Ishimine H., Yamakawa N., Sasao M., Tadokoro M., Kami D., Komazaki S., Tokuhara M., Takada H., Ito Y., Kuno S., Yoshimura K., Umezawa A., Ohgushi H., Asashima M., Kurisaki A. 2013. N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 438 : 753—759.

- Jansen B. J., Gilissen C., Roelofs H., Schaap-Oziemlak A., Veltman J. A., Raymakers R. A., Jansen J. H., Kogler G., Figdor C. G., Torensma R., Adema G. J. 2010. Functional differences between mesenchymal stem cell populations are reflected by their transcriptome. *Stem Cells. Develop.* 19 : 481—490.
- Jia Q., Zhang X., Deng T., Gao J. 2013. Positive correlation of Oct4 and ABCG2 to chemotherapeutic resistance in CD90(+) CD133(+) liver cancer stem cells. *Cell Reprogram.* 15 : 143—150.
- Krylova T. A., Bystrova O. A., Jakovleva T. K., Zenin V. V., Moiseeva O. M., Parfenov V. N., Martynova M. G. 2011. Characteristics of human subepicardial adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cell Studies.* 1 (1) : 115—122.
- Lobba A. R., Forni M. F., Carreira A. C., Sogayar M. C. 2012. Differential expression of CD90 and CD14 stem cell markers in malignant breast cancer cell lines. *Cytometry* 81 : 1084—1091.
- Michel M., Torok N., Godbout M. J., Lussier M., Gaudreau P., Royal A., Germain L. 1996. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J. Cell Sci.* 109 : 1017—1028.
- Musina R. A., Bekchanova E. S., Belyavskii A. V., Sukhikh G. T. 2006. Differentiation potential of mesenchymal stem cells of different origin. *Bull. Exp. Biol. Med.* 141 : 147—151.
- Przybyt E., Harmsen M. C. 2013. Mesenchymal stem cells: promising for myocardial regeneration? *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 8 : 270—277.
- Rabkin S. W. 2006. Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. *Obes. Rev.* 8 : 253—261.
- Rica D. C., Reardon M. J. 2010. Left heart sarcomas. *Methodist. Debakey. Cardiovasc. J.* 6 : 49—56.
- Salameh A., Dhein S. 2005. Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer? *Biochim. biophys. acta.* 1719 : 36—58.
- Schubert K., Gutknecht D., Köberle M., Anderegg U., Saalbach A. 2013. Melanoma cells use Thy-1 (CD90) on endothelial cells for metastasis formation. *Amer. J. Pathol.* 182 : 266—276.
- Simpson D. L., Mishra R., Sharma S., Goh S. K., Deshmukh S., Kaushal S. 2012. A strong regenerative ability of cardiac stem cells derived from neonatal hearts. *Circulation.* 126 (11 Suppl. 1) : S46—S53.
- Spath C., Schlegel F., Leontyev S., Mohr F. W., Dhein S. 2013. Inverse relationship between tumor proliferation markers and connexin expression in a malignant cardiac tumor originating from mesenchymal stem cell engineered tissue in a rat *in vivo* model. *Front. Pharmacol.* 4 : 42. doi: 10.3389/fphar.2013.00042.
- Taléns-Visconti R., Bonora A., Jover R., Mirabet V., Carbonell F., Castell J. V., Gómez-Lechón M. J. 2006. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J. Gastroenterol.* 12 : 5834—5845.
- Yan X., Luo H., Zhou X., Zhu B., Wang Y., Bian X. 2013. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines. *Oncol. Rep.* doi: 10.3892/or.2013.2784.
- Zhu Y., Liu T., Song K., Fan X., Ma X., Cui Z. 2008. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell. Biochem. Funct.* 26 : 664—675.
- Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 4279—4295.

Поступила 20 XI 2013

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE STEM CELLS ISOLATED FROM SUBCUTANEOUS AND SUBEPICARDIAL ADIPOSE TISSUE

T. A. Krylova,¹ O. A. Bystrova,¹ A. A. Khudyakov,^{1,2} A. B. Malashicheva,^{2,3} O. M. Moiseeva,² V. V. Zenin,¹ M. G. Martynova¹¹ Institute of Cytology RAS, ² V. A. Almazov Federal Center for Heart, Blood and Endocrinology, St. Petersburg, and ³ Department of Embryology, St. Petersburg State University; e-mail: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

Background. Stem cells (SCs) considerably vary in morphological, immunophenotypic, proliferative, and differentiation characteristics depending on their tissue source. The comparative analysis of their biological properties is essential for the optimal choice of SCs for regenerative therapies. **Methods.** Using immunocytochemistry, flow cytometry, histochemistry and real-time RT-PCR, we have investigated SCs obtained from human subepicardial (SEC-AT) and subcutaneous (SC-AT) adipose tissue and cultured under similar culture conditions without any differentiation-promoting factors. **Results.** The cultures were similar in the high proportion of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive cells. In both cultures, immunophenotyping has revealed high expression of mesenchymal stem cell surface markers CD29, CD44, CD73, and CD105, low expression of CD31, CD34 and CD45, and wide variability in CD117, CD146 and CD309 expression. The only distinction in CD marker profile was significantly lower expression of CD90 in SCs from SEC-AT. Histochemical analysis has shown the lack of Oil Red O-positive cells in both cultures and about ten-fold higher number of alkaline phosphatase-positive cells among SCs from SC-AT. In the both cultures, immunocytochemistry has detected similar low expression of slow myosin heavy chain marker MAB1628 and smooth muscle actin marker α -hSMA. Gap junctional protein Connexin-43 expression was markedly higher in SCs from SC-AT, and epithelial cell marker Cytokeratin-19 expression was detected only in these cells. By RT-PCR, GATA4 mRNA was found to be highly expressed only in SCs from SEC-AT. **Conclusions.** Our results suggest that SC-AT, as compared with SEC-AT, is richer in epithelial cell and osteogenic progenitors. In turn, SEC-AT possesses cardiomyogenic SCs, and can be considered as an alternative to SC-AT as a source of SCs for cell cardiotherapy.

Key words: immunocytochemistry, immunophenotyping, RT-PCR, GATA4.