

АНАЛИЗ СЕКРЕЦИИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА, ЭНДОМЕТРИЯ И ЖИРОВОЙ ТКАНИ

© В. И. Земелько,¹ И. В. Кожухарова,^{1, 2} З. В. Ковалева,^{1, 2} А. П. Домнина,¹
Н. А. Пуговкина,^{1, 2} И. И. Фридлянская,^{1, 2} М. В. Пузанов,² С. В. Анисимов,^{1, 2}
Т. М. Гринчук,^{1, 2} Н. Н. Никольский^{1, 3}

¹ Институт цитологии РАН,

² Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, и

³ С.-Петербургский государственный политехнический университет;
электронный адрес: vzelko@mail.ru

Способность мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) дифференцироваться в нейрональном направлении определяет потенциал этих клеток как субстрата заместительной клеточной терапии. В настоящей работе сравнивали нейрогенный потенциал МСК, выделенных из костного мозга (МСК-КМ), подкожной жировой ткани (МСК-ЖТ) и менструальной крови (эМСК). Для статистического анализа использовали по три линии каждого типа МСК, полученных от разных доноров. Показали, что исходные клетки эМСК, МСК-КМ и МСК-ЖТ экспрессируют нейрональный маркер β -III-тубулин с частотой 90, 50 и 14 % соответственно. Кроме того, эМСК секретируют нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) на высоком, а МСК-КМ и МСК-ЖТ на низком базальном уровне. Направленная дифференцировка МСК в нейрональном направлении в среде, содержащей добавки N2 и B27, 5-азациитидин, ретиноевую кислоту, IBMX и dbcAMF, сопровождалась изменением морфологии клеток, усилением экспрессии β -III-тубулина и появлением нейрональных маркеров GFAP, NF-H, NeuN и MAP2. Секретция BDNF в процессе дифференцировки значительно усиливалась в МСК-КМ и уменьшалась в эМСК. Однако зависимости индуцированного уровня экспрессии нейрональных маркеров от базального в изученных МСК не обнаружили.

Ключевые слова: клеточная терапия, мезенхимные стволовые клетки, нейротрофические факторы.

Принятые сокращения: ЖТ — жировая ткань, КМ — костный мозг, МСК — мезенхимные стволовые клетки, эМСК — эндометриальные МСК, МСК-КМ — МСК костного мозга, МСК-ЖТ — МСК жировой ткани, dbcAMF — дибутирил-цАМФ, GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок, IBMX — изобутилметилксантин, MAP2 — белок, ассоциированный с микротрубочками, NF-H — нейрональные филаменты, NeuN — нейрональные ядра.

Трансплантация региональных стволовых клеток для лечения нейродегенеративных заболеваний и травм приобретает все большую актуальность. Активный интерес проявляется к лечению болезней Паркинсона, Хантингтона, Альцгеймера, а также к лечению инсультов, травм позвоночника и головного мозга. Мезенхимные стволовые клетки человека (МСК) обладают целым рядом преимуществ перед другими типами стволовых клеток. Высокая доступность, относительная простота установления их первичных культур, значительный пролиферативный потенциал и высокий уровень пластичности делают МСК привлекательным субстратом клеточной терапии, а изучение фундаментальных свойств МСК важно для понимания механизмов, лежащих в процессе пролиферации и дифференцировки стволовых клеток в целом.

К настоящему времени источниками МСК являются костный мозг, подкожная висцеральная жировая ткань, ткань эндометрия, плацента, пуповинная кровь, ткани

скелетных мышц, хрящей и сухожилий, пульпа зуба и амниотическая жидкость (Hass et al., 2011). Исторически наиболее изученной клеточной популяцией являются МСК костного мозга (МСК-КМ) (Fridenstein et al., 1968), которые способны дифференцироваться не только в многочисленные типы клеток мезодермы (Caplan 1991; Pittenger et al., 1999), но и в клетки других зародышевых листков, включая нейроны и глиальные клетки (Woodbury et al., 2000; Kim et al., 2002). Однако сама процедура пункции костного мозга является болезненной и связана с определенным количеством осложнений. Кроме того, популяция МСК-КМ в составе костного мозга немногочисленна (0.01—0.001 % от общего числа клеток). Все чаще альтернативными источниками МСК становятся жировая ткань (Gronthos et al., 2001; Zuk et al., 2002) и ткань эндометрия (Cho et al., 2004; Gargett, 2006; Meng et al., 2007). Существенным преимуществом МСК жировой ткани (МСК-ЖТ) и МСК эндометрия (эМСК) являются не толь-

ко безболезненность и легкость их выделения, но и их относительно высокая пролиферативная активность, которая определяет эффективность экспансии клеток *in vitro* (Gronthos et al., 2001; Meng et al., 2007; Земелько и др., 2011). Как и МСК-КМ, прочие популяции МСК также обладают высокими уровнем пластичности. Было показано, что эМСК, выделенные из менструальной крови, могут быть дифференцированы в различные типы клеток трех зародышевых листков — мезодерму, энтодерму и эктодерму (нейроны, астроциты и клетки эпидермиса) (Meng et al., 2007; Мусина и др., 2008; Patel et al., 2008; Земелько и др., 2011). МСК-ЖТ также обладают способностью дифференцироваться как в пределах мезодермы (Zuk et al., 2002), так и трансдифференцироваться в клетки эндотелия (Planat-Benard et al., 2004), кардиомиоциты (Rangappa et al., 2003), нейроны и глиальные клетки (Safford et al., 2002; Лопатина и др., 2008). В нашей предыдущей работе (Земелько и др., 2013) было показано, что все вышеуказанные культуры МСК обладают мультипотентной пластичностью и предрасположенностью к нейрогенезу, что выражается в экспрессии маркеров плюрипотентности (SSEA-4 и нейрональных предшественников нестина и β -III-тубулина) в недифференцированных клетках. Используя различные протоколы, мы подтвердили возможность дифференцировки все трех типов МСК как в глиальные клетки, так и в зрелые нейроны, экспрессирующие спектр специфических биохимических и генетических маркеров.

К настоящему времени хорошо известно, что трансплантация различных типов МСК по поводу нейродегенеративных заболеваний, инсульта и травм (моделируемых у экспериментальных животных) может сопровождаться терапевтическим эффектом (Ye et al., 2007; McCooy et al., 2008; Borlongan et al., 2010). Положительное влияние при лечении может определяться способностью МСК мигрировать к месту поврежденной ткани, дифференцироваться, замещая поврежденные нервные клетки (Si et al., 2011). Однако часть авторов полагают, что терапевтический эффект трансплантации МСК обусловлен непрямым механизмом (Scuteri et al., 2011). Установлено, что МСК способны синтезировать и секретировать сложный коктейль белковых молекул — трофических и антиапоптотических факторов, что, возможно, и лежит в основе механизма их действия (Zhang et al., 2013; Paul, Anisimov, 2013).

В нашем предыдущем исследовании (Земелько и др., 2013) мы показали, что МСК способны секретировать нейротрофические факторы нейротрофин 3 и 4 и нейротрофический фактор головного мозга (BDNF). 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). Целью данной работы явилось проведение сравнительного анализа в нескольких линиях МСК-КМ, МСК-ЖТ и эМСК базального уровня синтеза этого фактора, его изменения при направленной нейрональной дифференцировке данных клеток, а также исследование зависимости синтеза BDNF от длительности культивирования МСК.

Материал и методика

Культивирование клеток. 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). Исследование проводили в соответствии со стандартами Хельсинской декларации (1989). Первичные культуры МСК устанавливали согласно протоколу, подробно описанному ранее (Земелько и др., 2011). Адгезивную клеточную популяцию МСК культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров (HyClone, США), 1 % смеси антибиотиков (PenStrep, Gibco, США) и 1 % глутамакса (Gibco, США). Условия культивирования являлись стандартными: 37 °C, 5 % CO₂, влажность 85 %. Пересев клеток проводили с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и ЭДТА (Gibco, США) 2 раза в неделю, в соотношении 1 : 3.

Нейрональная дифференцировка МСК *in vitro*. После предварительного культивирования МСК-КМ и МСК-ЖТ в присутствии 10 мкг/мл 5-азациитидина (Sigma, США) в ростовой среде в течение 2 сут клетки МСК всех типов (МСК-КМ, МСК-ЖТ и эМСК) диссоциировали с помощью 0.05%-ного трипсина и ЭДТА и пересевали в 24-луночные панели (Costar, США), покрытые матригелем (Matrigel; BD Bioscience, США), в плотности 150 тыс. клеток на лунку. На следующий день ростовую среду меняли на дифференцировочную бессывороточную среду, состоящую из Neurobasal Medium (Gibco), 1 % смеси антибиотиков, 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 мМ дибутирил-цАМФ (dbcAMF, Sigma) и 0.25 мМ изобутил-метилксантина (IBMX; Sigma) на 1—2 сут для МСК КМ и ЖТ; для нейрональной дифференцировки эМСК в среду кроме перечисленных индукторов добавляли 1 мМ ретиноевой кислоты (RA; Sigma) и инкубировали в течение 4 сут.

Иммуноцитохимический анализ. Флуоресцентное окрашивание антигенов β -III-тубулина, промежуточных нейрональных филаментов (NF-H), нейрональных ядер (NeuN), глиального кислого фибриллярного белка (GFAP) и взаимодействующего с микротрубочками белка MAP2 проводили согласно стандартному протоколу. Клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma) и пермеабелизовывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 (Merk, США). Неспецифическое связывание блокировали, используя 1%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma) и 5 %-ный раствор козьей сыворотки (Sigma) на PBS, инкубировали в течение 30 мин. Использовали мышинные моноклональные антитела против β -III-тубулина в разведении 1 : 1000 (Chemicon, США), против NF-H (Abcam, США), NeuN (Millipore, США), GFAP (Chemicon) и MAP2 (Millipore) в соотношении 1 : 100, а также кроличьи поликлональные антитела против GFAP (1 : 100, Abcam). Клетки с первыми антителами инкубировали не менее 12 ч (ночь) при 4 °C. В качестве вторых антител использовали козы антимышинные иммуноглобулины Dylight 488 (1 : 400) от компании Jackson ImmunoResearch (США), или козы антикроличьи антитела (Alexa 568, Invitrogen, США). Ядра окрашивали раствором DAPI (Sigma) в концентрации 1 мкг/мл. Готовые покровные стекла заливали стандартным раствором (ProLong Gold antifade

reagent, LifeSci, США) и анализировали с помощью микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия) и камеры Lieca DFC 420C (Lieca, Германия). Клетки, позитивные по исследуемому маркеру, считали при увеличении объектива 40× при стандартных условиях экспозиции в 5 полях зрения.

Анализ уровня секреции нейротрофического фактора головного мозга (BDNF). Иммуноферментный анализ культуральной среды МСК проводили, используя набор реагентов DuoSet ELISA Development System for human BDNF (R&D systems, США). Согласно рекомендациям фирмы-производителя, на подготовленные 96-луночные платы наносили стандартный рекомбинантный фактор BDNF человека в качестве позитивного контроля и супернатант клеток до и после дифференцировки *in vitro*. Через 2 ч инкубации при комнатной температуре добавляли биотинилированные антитела против BDNF человека и выдерживали в течение 2 ч при комнатной температуре. Для выявления связавшихся 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 ФЛУОРОФОТ (Россия). Все измерения были проведены в трех повторностях.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены средними значениями и их ошибкой. Различия между средними оценивали при 5%-ном уровне значимости ($P < 0.05$). Для сравнения суммарного нейрогенного потенциала использовали непараметрический ранговый критерий.

Результаты

В работе были использованы 4 линии МСК-КМ, 3 линии МСК-ЖТ и 3 линии эМСК (каждая линия соответствует 1 донору). Нейрогенный потенциал этих клеток ис-

следовали на ранних пассажах после выделения и на более поздних (7—9-й пассаж) после криоконсервации.

В первую очередь был изучен базальный уровень экспрессии нейральных признаков в МСК разного происхождения. Все три типа МСК экспрессировали нейрональный маркер β -III-тубулин в разной степени, причем по мере пассирования *in vitro* клетки укрупнялись и более интенсивно окрашивались на β -III-тубулин (рис. 1 *а, б*). Сравнение трех типов МСК показало, что на ранних пассажах чаще всего ярко окрашенные на β -III-тубулин клетки встречаются в культуре МСК-КМ (от 28 до 87 % β -III-тубулин-положительных клеток у разных доноров); в культуре эМСК они составляют 25—39 %, а в 3 линиях МСК-ЖТ выявлено лишь 5 % позитивных по β -III-тубулину клеток. По мере культивирования до 9-го пассажа количество тубулин-позитивных клеток возрастало до 100 % среди эМСК и до 14 % среди МСК-ЖТ; МСК-КМ не удается пассировать свыше 6-го пассажа.

Экспрессия глиального маркера GFAP была выявлена в 2 линиях МСК-ЖТ (4 и 9 % соответственно), а экспрессия нейронального маркера NF-H — в 3 линиях МСК-ЖТ (от 6 до 16 %) и 2 линиях МСК-КМ (10 и 45 % соответственно).

Исследование базального уровня секреции нейротрофического фактора BDNF с помощью иммуноферментного анализа показало, что все 3 линии эМСК секретировали BDNF в концентрации от 74 до 196 пг/мл, 2 линии МСК-ЖТ — в концентрации 35 пг/мл и 3 линии МСК-КМ — от 20 до 188 пг/мл. В табл. 1 представлены данные о базальном уровне экспрессии нейрональных маркеров в 3 типах МСК.

Статистический анализ полученных данных позволяет сделать достоверный вывод о секреции клетками эМСК нейротрофического фактора BDNF, наличии маркера нейрональной дифференцировки β -III-тубулина во всех типах МСК и маркера NF-H в МСК-ЖТ, а также о высокой вариабельности по экспрессии нейрональных маркеров в МСК-КМ от разных доноров.

Индукция нейрональной дифференцировки в среде, содержащей добавки N2 и B27, 5-азациитидин, ретиноевую кислоту, IBMX и dbcAMF, в течение 7 сут вызывала заметное изменение размеров и морфологии клеток

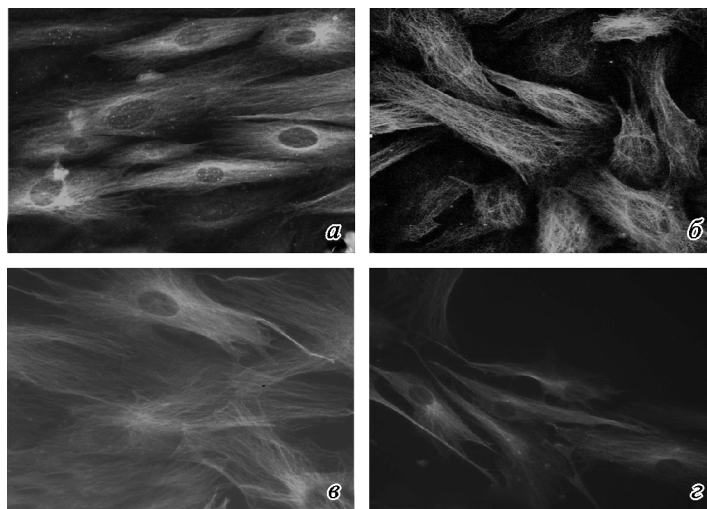


Рис. 1. Иммунофлуоресценция β -III-тубулина в интактных МСК эндометрия (эМСК), костного мозга (МСК-КМ) и жировой ткани (МСК-ЖТ).

а — эМСК п 3, *б* — эМСК п 9, *в* — МСК-КМ п 3, *з* — МСК-ЖТ п 3. Об. 40×.

Таблица 1

Базальный уровень экспрессии нейрональных маркеров в МСК разного происхождения

Линия	Пассаж	β -III-тубулин, %	GFAP, %	NF-H, %	BDNF, пг/мл
эмСК	5-й	32 \pm 4	Нет	Нет	146 \pm 16
»	9-й	91 \pm 9	»	»	151 \pm 11
МСК-ЖТ	5-й	5 \pm 1	»	»	32 \pm 1
	9-й	14 \pm 1	5 \pm 2	12 \pm 3	37 \pm 1
МСК-КМ	4-й	50 \pm 12	Нет	18 \pm 11	63 \pm 46

(рис. 2). Результаты иммуноцитохимического исследования (с окрашиванием клеток на нейрональные маркеры GFAP, NF-H, NeuN и MAP2) подтвердили появление или усиление экспрессии признаков нейрогенеза. Так, было выявлено значительное увеличение количества клеток, маркированных глиальным белком цитоскелета GFAP в 2 из 3 линий эмСК и во всех линиях МСК-ЖТ и МСК-КМ. Частота встречаемости GFAP-позитивных клеток варьировала от 20 до 88 %. Нейрональный маркер ядра NeuN был выявлен в 2 линиях эмСК (100 %), в 2 МСК-ЖТ (22 и 100 %) и в 2 МСК-КМ (63 и 85 %). Все МСК ЖТ и КМ экспрессировали белок нейрофиламентов NF-H с частотой от 45 до 84 %; кроме этого, МСК-ЖТ эк-

спрессировали белок, ассоциированный с микротрубочками MAP2 (от 25 до 81 % позитивных клеток). MAP2 был выявлен в 2 из 3 дифференцированных линий эмСК с частотой 53 и 72 %.

Изменение секреции BDNF в процессе нейрональной дифференцировки было неоднозначным. Так, в двух линиях эмСК она снижалась, все 3 линии МСК ЖТ секретируют BDNF на уровне, близком к базальному, а все линии МСК КМ от разных доноров увеличили секрецию BDNF (от 42 до 1100 пг/мл). В табл. 2 представлены данные о частоте встречаемости позитивноокрашенных клеток на исследованные маркеры после индукции нейрональной дифференцировки в МСК от разных доноров,

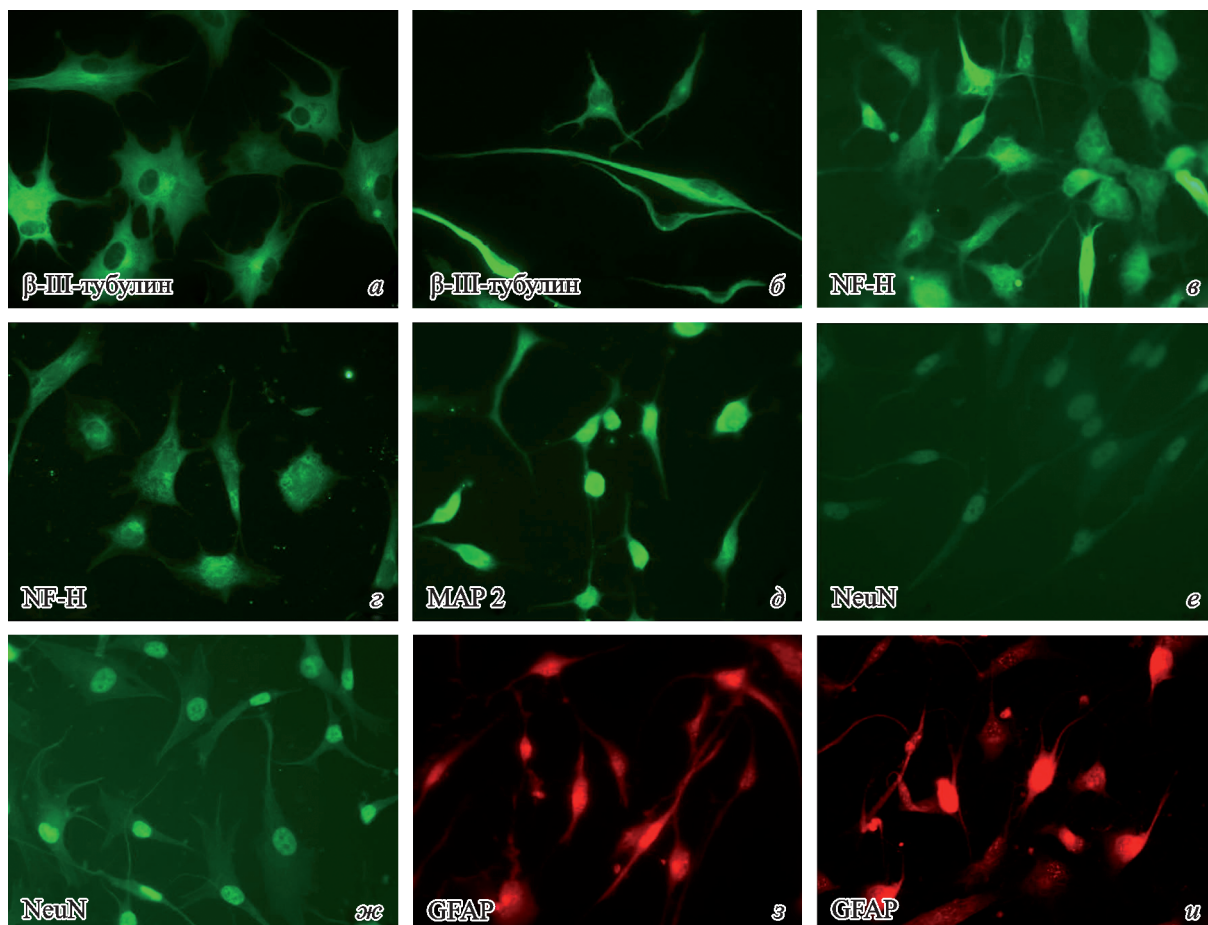


Рис. 2. Экспрессия новых нейрональных маркеров в МСК и изменение их морфологии в процессе направленной нейрональной дифференцировки *in vitro*.

Имунофлуоресценция: β -III-тубулина в МСК-ЖТ (а) и эмСК (б); белка промежуточных нейрофиламентов NF-H в МСК-ЖТ (в) и МСК-КМ (з); белка, ассоциированного с микротрубочками MAP2 в МСК-ЖТ(д); белка нейронального ядра NeuN в эмСК (е) и МСК-КМ (ж); глиального фибриллярного кислого белка GFAP в эмСК (з) и МСК-КМ (и). Об. 40 \times .

Таблица 2

**Индукцированный уровень экспрессии нейрональных маркеров в МСК
разного происхождения**

Линия	β -III-тубулин, %	GFAP, %	NeuN, %	NF-H, %	MAP2, %	BDNF, пг/мл
эмСК	75 \pm 4	40 \pm 13	67	НО	42 \pm 21	77 \pm 43
МСК-ЖТ	92 \pm 5	61 \pm 13	41	75 \pm 4	46 \pm 17	37 \pm 2
МСК-КМ	61 \pm 13	68 \pm 9	37	61 \pm 7	НО	492 \pm 164

Примечание. Нейрональную дифференцировку индуцировали с помощью 5-азациитидина, ретиноевой кислоты, N2, B27, dFGF, EGF, IBMX и dbcAMF в течение 7 сут (см. раздел «Материал и методика»); НО — не определяли.

культивируемых после криоконсервации до пассажей 5—9, и о секреции этими клетками BDNF.

Статистическая обработка результатов позволяет сделать вывод об усилении экспрессии β -III-тубулина в ходе направленной нейрональной дифференцировки *in vitro* в МСК-ЖТ и эмСК, глиального фибриллярного белка GFAP во всех типах МСК, белка нейрофиламентов NF-H в МСК-ЖТ и МСК-КМ и белка, ассоциированного с микротрубочками MAP2, в МСК-ЖТ и эмСК. Кроме того, можно сделать вывод об усилении секреции BDNF в МСК-КМ. Следует отметить высокую вариабельность индукции нейрональных признаков внутри каждого типа МСК, особенно по поздним маркерам нейрогенеза NeuN и MAP2.

На рис. 3 представлена гистограмма, показывающая изменение экспрессии нейрональных белков в культурах МСК в ответ на индукцию нейрональной дифференцировки. Представленные данные отражают увеличение количества позитивно окрашенных клеток по всем изученным маркерам во всех типах МСК и усиление секреции нейротрофина BDNF в культуре МСК-КМ относительно базального уровня. Зависимости экспрессии нейрональных маркеров в МСК, подвергнутых дифференцировке *in*

vitro, от базального уровня экспрессии β -III-тубулина в исходных клетках не выявили. Суммарно по всем изученным маркерам МСК-ЖТ проявили более высокий нейрогенный потенциал, хотя базальный уровень экспрессии β -III-тубулина в клетках эмСК был выше. Секреция BDNF усилилась только в МСК-КМ, хотя в исходных клетках его уровень был меньше, чем в эмСК и МСК-ЖТ.

Обсуждение

Несмотря на большое количество исследований по изучению пластичности МСК *in vitro* и уже начавшееся (в формате клинических испытаний) применение МСК для лечения нейродегенеративных заболеваний (Ye et al., 2007; McCoy et al., 2008; Borlongan et al., 2010), многие вопросы, относящиеся к биологии МСК, остаются нерешенными. До сих пор неясно, влияет ли базальный уровень экспрессии нейрональных маркеров на пластичность МСК. В настоящей работе сравнивали степень пластичности МСК различного происхождения. Кроме того, оценивали вариабельность нейрональных маркеров внутри каждого типа МСК в клетках линий, полученных от разных доноров, в зависимости от времени культивирования, факта криоконсервации и базального уровня экспрессии нейрональных маркеров.

Ранее мы разработали протокол нейрональной дифференцировки, позволяющий стабильно получать *in vitro* клетки с нейрональной и глиальной морфологией, экспрессирующие нейрональные и глиальные маркеры из МСК-КМ, МСК-ЖТ и эндометрия (Земелько и др., 2013).

Исследование экспрессии нейрональных маркеров в полученных культурах МСК выявило, что интактные (необработанные) эмСК и МСК-КМ экспрессируют белок микротрубочек β -III-тубулин, характерный для цитоскелета нейронов, а МСК-ЖТ с большей частотой экспрессируют глиальный фибриллярный белок и белок нейрофиламентов. Кроме этого, эмСК от разных доноров секретируют нейротрофический фактор BDNF на высоком базальном уровне. Эти данные согласуются с результатами работ других авторов, подтверждающих экспрессию многих нейрональных генов и белков в недифференцированных МСК различного происхождения (Tondreau et al., 2004; Blondheim et al., 2006; Deng et al., 2006). Нами впервые было показано, что эмСК секретируют нейротрофин BDNF на высоком уровне. Направленная дифференцировка МСК *in vitro* вызвала усиление экспрессии имеющихся нейрональных маркеров и появление новых, более поздних маркеров MAP2 и NeuN. Сравнивая между со-

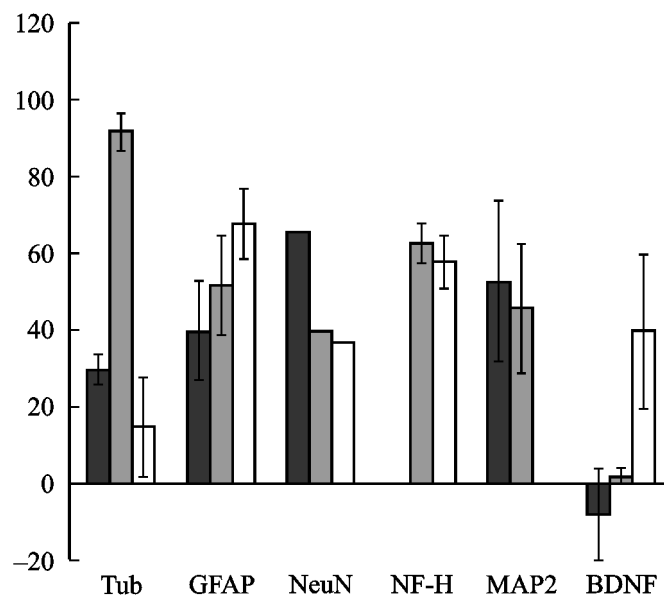


Рис. 3. Изменение экспрессии нейрональных маркеров в ходе направленной дифференцировки *in vitro* эмСК (черные столбцы), МСК-ЖТ (серые столбцы) и МСК-КМ (белые столбцы).

По оси ординат — доля клеток (%), в которых экспрессия нейрональных маркеров превышает базальный уровень (нулевая линия). Tub — β -III-тубулин.

бой разные типы МСК, можно сказать, что МСК-КМ с большей частотой дифференцируются в клетки глиального типа (GFAP — маркер зрелых астроцитов), эМСК — в клетки нейронального типа, а МСК-ЖТ — в клетки и глиального, и нейронального типов. Секреция BDNF усиливалась только в МСК-КМ (в 3 из 4 линий). Однако возможно, что такие результаты специфичны для использованного нами протокола нейрональной дифференцировки, так как показано, что МСК-КМ могут дифференцироваться *in vitro* в глиальные или нейрональные клетки в зависимости от индуктора (Hermann et al., 2006). Мы провели сравнительный анализ нейрогенного потенциала МСК разного происхождения с использованием близких протоколов дифференцировки. По нашим данным, МСК-ЖТ проявили более высокий нейрогенный потенциал *in vitro*, так как они под действием индукторов нейрональной дифференцировки экспрессировали широкий набор нейрональных маркеров.

К настоящему времени на животных моделях проведено большое количество успешных экспериментов по лечению нейродегенеративных заболеваний с использованием трансплантации как нативных, так и нейрально-индуцированных МСК-КМ, МСК-ЖТ и эМСК. Улучшение моторной функции, протективное и регенеративное действие наблюдали при лечении болезнью Паркинсона (Pavon-Fuentes et al., 2004; McCoy et al., 2008; Blandini et al., 2010; Wolff et al., 2011; Park et al., 2012) и Хантингтона (Molero et al., 2009; Olson et al., 2012; Sadan et al., 2012), а также при лечении инсульта (Kang et al., 2003; Kurozumi et al., 2005; Borlongan et al., 2010; Wakabayashi et al., 2010) и повреждений спинного мозга (Sasaki et al., 2009). Тем не менее остается открытым вопрос о роли МСК в процессе регенерации. Обширный экспериментальный материал свидетельствует о том, что МСК могут участвовать в этом процессе благодаря паракринному эффекту. Секреция ростовых факторов, в особенности BDNF и GDNF, оказывает нейротрофический и антиапоптотический эффекты на дофаминергические нейроны (Sauer et al., 1993; Kearns, Gash, 1995; Glavaski-Joksimovic et al., 2010). Бландини и соавторы (Blandini et al., 2010) предполагают, что в этом случае возможна дифференцировка МСК в глиальные клетки *in vivo*, что еще более усиливает секрецию GDNF. При трансплантации МСК для лечения инсультов и травм мозга улучшалась выживаемость нейронов реципиента на фоне уменьшения уровня апоптотических маркеров (Li et al., 2002; Kim et al., 2010). Было показано, что МСК-ЖТ через секрецию BDNF способствовали восстановлению нервных окончаний и росту аксонов у нейронов периферической нервной системы (Lopatina et al., 2011). Кроме этого, показано, что BDNF наряду с другими ростовыми факторами, такими как NGF, основной фактор роста фибробластов (bFGF) и эпидермальный фактор роста (EGF) стимулируют нейрональную дифференцировку в исследуемых нами МСК (Лопатина et al., 2008; Anghileri et al., 2008; Brohlin et al., 2012; Noureddini et al., 2012; Земелько et al., 2013).

Наши данные указывают на то, что уровень секреции нейротрофина BDNF культурами МСК различен. Наиболее стабилен он в эМСК, так как 3 линии от разных доноров в течение 9 пассажей секретировали BDNF на высоком уровне. Однако нейрональная дифференцировка *in vitro* в данных условиях не вызывала усиления секреции. Таким образом, эМСК могут послужить удачной моделью для изучения влияния различных факторов на син-

тез BDNF как *in vitro*, так и *in vivo* при трансплантации. С другой стороны, несмотря на высокую вариабельность по этому признаку, линии МСК-КМ усиливали секрецию нейротрофина после нейрональной дифференцировки, что говорит о высокой пластичности МСК-КМ и согласуется с работами других авторов (Brohlin et al., 2012). Следует отметить, что базальный уровень секреции BDNF в МСК-КМ невысок, поэтому применение МСК-КМ для трансплантации необходимо проводить с предварительной индукцией клеток в нейрональном направлении. Это подтверждается результатами, полученными при трансплантации генетически модифицированных МСК животным, моделирующим болезнь Паркинсона (Wu et al., 2010; Moloney et al., 2010). Генетически модифицированные МСК с усиленной секрецией BDNF и GDNF улучшили результаты поведенческих тестов у крыс с экспериментально вызванным инсультом и значительно уменьшили область ишемического повреждения по сравнению с интактными МСК-КМ (Kurozumi et al., 2005).

Таким образом, наши данные, как и большинство других экспериментальных данных, указывают на возможный паракринный механизм терапевтического эффекта МСК при лечении повреждений 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

- 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 (11): 919—929. (Zemelko V. I., Grinchuk T. M., Domnina A. P., Artzibasheva I. V., Zenin V. V., Kirsanov A. A., Bichevaia N. K., Korsak V. S., Nikolskiy N. N. 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 6 (1): 1—11.)
- Земелько В. И., Кожухарова И. В., Алексеенко Л. Л., Домнина А. П., Решетникова Г. Ф., Пузанов М. В., Дмитриева Р. И., 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., Kozhucharova I. B., Alekseenko L. L., Domnina A. P., Reshetnikova G. F., Puzanov M. V., Dmitrieva R. I., Grinchuk T. M., Nikolskiy 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. (Tsitologiya). 7 (3): 235—244.)
- Лопатина Т. В., Калинина Н. И., Ревущин А. В., Беме А. А., Спиридова 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. (Cell Transpl. Tissue Engineer. 3(4): 50—55.)
- Мусина Р. А., Белявский А. В., Тарусова О. В., Соловьева Е. В., Сухих Г. Т. 2008. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Клин. техн. биол. мед. 2: 110—114. (Musina R. A., Belyavski A. V., Tarusova O. V., Solovyova E. V., Sukhikh G. T. 2008. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. Bull. Exp. Biol. Med. 145 (4): 539—543.)

- 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.
- Anghileri E., Marconi S., Pignatelli A., Cifelli P., Galie M., Sbarbati A. 2008. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Develop.* 17 (5) : 909—916.
- Blandini F., Cova L., Armentero M. T., Zennaro E., Levandis G., Bossolasco P., Calzarossa C., Mellone M., Giuseppe B., Delilieri G. L., Polli E., Nappi G., Silani V. 2010. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Cell Transplant.* 19 : 203—217.
- 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 Develop.* 19 : 439—452.
- Blondheim N., Levy Y., Ben-Zur T., Burshtein A., Cherlow T., Kan I., Barsilai 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 Develop.* 15 : 141—164.
- Brohlin M., Kingham P., Novikova L., Novikov L., Wiberg M. September 2012. Aging effect on neurotrophic activity of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 7 : e45052.
- Caplan A. I., 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9 : 641—650.
- Cho N. H., Park Y. K., Kim Y. T., Yang H., Kim S. K. 2004. Lfetim expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil. Steril.* 81 : 403—407.
- Deng J., Petersen B. E., Steindler D. A., Jorgensen M. L., Laywell E. D. 2006. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 24 : 1054—1064.
- Friedenstein A. J., Petrakova K. V., Kurolesova A. I., Frolova G. P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 6 : 230—247.
- Gargett C. E. 2006. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol.* 46 : 250—253.
- Glavaski-Joksimovic A., Virag T., Mangatu T. A., McGrogan M., Wang X. S., Bohn M. C. 2010. Glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting genetically modified human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote recovery in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* 88 (12) : 2669—2681.
- Gronthos S., Franklin D. M., Leddy H. A., Robey P. G., Storms R. W., Gimble J. M. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 189 : 54—63.
- Hass R., Kasper C., Bohm S., Jacobs R. 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal.* 9 : 12—23.
- Hermann A., Liebau S., Gastl R., Fickert S., Habisch H., Fiedler J., Schwarz J., Brenner R., Storch A. 2006. Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols. *J. Neurosci. Res.* 83 : 1502—1514.
- 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.
- Kearns C. M., Gash D. M. 1995. GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine *in vivo*. *Brain Res.* 672 : 104—111.
- 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.
- Kim H. J., Lee J. H., Ki S. H. 2010. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. *J. Neurotrauma*. 27 : 131—138.
- Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T., Kawano Y., Ishii K., Kobune M., Hirai S., Uchida H., Sasaki K., Ito Y., Kato K., Honmou O., Houkin K., Date I., Hamada H. 2005. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther.* 11 : 96—104.
- Li Y., Chen J., Chen X. G., Wang L., Gautam S. C., Xu Y. X., Katakowski M., Zhang L. J., Lu M., Janakiraman N., Chopp M. 2002. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*. 59 : 514—523.
- Lopatina T., Kalinina N., Karagyaur M., Stambolsky D., Rubina K., Revischin A., Pavlova G., Parfyonova Y., Tcachuk V. 2011. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth *de novo*. *PLoS ONE*. 6 : e17899.
- McCoy M. K., Martinez T. N., Ruhn K. A., Wrage P. C., Keefer E. W., Botterman B. R., Tansey K. E., Tansey M. G. 2008. Autologous dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 210 : 14—29.
- Meng X., Ichim T. E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thebaud 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.* 106 : 21 900—21 905.
- Moloney T. C., Rooney G. E., Barry F. P., Howard L., Dowd E. 2010. Potential of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for delivery of neurotrophins to the parkinsonian rat brain. *Brain Res.* 1359 : 33—43.
- Meirelles L. S., Fontes A. M., Covas D. T., Caplan A. I. 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20 : 419—427.
- Noureddini M., Verdi J., Mortazavi-Tabatabaei S. A., Sharif S., Azimi A., Keyhanvar P., Shoaie-Hassani A. 2012. Human endometrial stem cell neurogenesis in response to NGF and bFGF. *Cell Biol. Int.* 36 : 961—966.
- Olson S. D., Pollock K., Kambal A., Cary W., Mitchell G., Tempkin J., Stewart H., McGee J., Bauer G., Kim H. S., Tempkin T., Wheelock V., Annett G., Dunbar G., Nolte J. A. 2012. Genetically engineered mesenchymal stem cells as a proposed therapeutic for huntington disease. *Mol. Neurobiol.* 45 : 87—98.
- Park H. J., Shin J. Y., Lee B. R., Kim H. O., Lee P. H. 2012. Mesenchymal stem cells augment neurogenesis in the subventricular zone and enhance differentiation of neural precursor cells into dopaminergic neurons in the substantia nigra of a parkinsonian model. *Cell Transplant.* 21 : 1629—1640.
- 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.
- Paul G., Anisimov S. V. 2013. The secretome of mesenchymal stem cells: potential implications for neuroregeneration. *Biochimie*. 95 : 2246—2256.
- Pavon-Fuentes N., Blanco-Lezcano L., Martinez-Martin L., Castillo-Diaz L., de la Cuetara-Bernal K., Garcia-Miniet R., Lorigados-Pedre L., Coro-Grave de Peralta Y., Garcia-Varona A. Y., Rosillo-Marti J. C., Macias-Gonzalez R. 2004. Stromal cell transplant in the 6-OHDA lesion model. *Rev. Neurol.* 39 : 326—334.
- 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.
- Planat-Benard V., Silvestre J. S., Cousin B., Andre M., Nibbelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Bar-

- reau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Penicaud L., Casteilla L. 2004. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 109 : 656—663.
- Rangappa S., Fen C., Lee E. H., Bongso A., Wei E. S. 2003. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann. Thorac. Surg.* 75 : 775—779.
- Sadan O., Eldad Melamed E., Offen D. 2012. Intrastriatal transplantation of neurotrophic factor-secreting human mesenchymal stem cells improves motor function and extends survival in R6/2 transgenic mouse model for Huntington's disease. *PLoS ONE* 4 : e4f7f6dc013d4e.
- Safford K. M., Hicok K. C., Safford S. D., Halvorsen Y. D., Wilkison W. O., Gimble J. M., Rice H. E. 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294 : 371—379.
- Sasaki M., Radtke C., Tan A. M., Zhao P., Hamada H., Houkin K., Honmou O., Kocsis J. D. 2009. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 29 : 14 932—14 941.
- Sauer H., Fischer W., Nikkha G., Wiegand S. J., Brundin P., Lindsay R. M., Bjorklund A. 1993. Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. *Brain Res.* 626 : 37—44.
- Scuteri A., Miloso M., Foudah D., Orciani M., Cavaletti G., Tredici G. 2011. Mesenchymal stem cells neuronal differentiation ability: a real perspective for nervous system repair? *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 6 : 82—92.
- Si Y. L., Zhao Y. L., Hao H. J., Fu X. B., Han W. D. 2011. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res. Rev.* 10 : 93—103.
- Tondreau T., Lagneaux L., Dejeneffe M., Massy M., Mortier C., Delforge A., Bron D. 2004. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation*. 72 : 319—326.
- Wakabayashi K., Nagai A., Sheikh A. M., Shiota Y., Naran-tuya D., Watanabe T., Masuda J., Kobayashi S., Kim S. U. Yamaguchi S. 2010. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J. Neurosci. Res.* 88 : 1017—1025.
- Wolff E. F., Gao X. B., Yao K. V., Andrews Z. B., Du H., Elsworth J. D., Taylor H. S. 2011. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *J. Cell. Mol. Med.* 15 : 747—755.
- Woodbury D., Schwarz E. J., Prockop D. J., Black I. B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61 : 364—370.
- Wu J., Yu W., Chen Y., Su Y., Ding Z., Ren H., Jiang Y., Wang J. 2010. Intrastriatal transplantation of GDNF-engineered BMSCs and its neuroprotection in lactacystin-induced Parkinsonian rat model. *Neurochem. Res.* 35 : 495—502.
- Ye M., Wang X. J., Zhang Y. H., Lu G. Q., Liang L., Xu J. Y., Sheng-Di C. 2007. Therapeutic effects of differentiated bone marrow stromal cell transplantation on rat models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 13 : 44—49.
- Zhang R., Liu Y., Yan K., Chen L., Chen X. R., Li P., Chen F. F., Jiang X. D. 2013. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. *J. Neuroinflamm.* 10 : 106—118.
- 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.
- Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. A., 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 11 XII 2013

BDNF SECRETION IN HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS ISOLATED FROM BONE MARROW, ENDOMETRIUM AND ADIPOSE TISSUE

V. I. Zemelko,¹ I. V. Kozhucharova,^{1,2} Z. V. Kovaleva,^{1,2} A. P. Domnina,¹ N. A. Pugovkina,^{1,2} I. I. Fridlyanskaya,^{1,2} M. V. Puzanov,² S. V. Anisimov,^{1,2} T. M. Grinchuk,^{1,2} N. N. Nikolsky^{1,3}

¹ Institute of Cytology RAS, ² V. A. Almazov Federal Center for Heart, Blood and Endocrinology, St. Petersburg, and ³ St. Petersburg State Polytechnic University; e-mail: vzelko@mail.ru

The ability of mesenchymal stem cells (MSCs) to differentiate into neuronal lineage determines the potential of these cells as a substrate for a cell replacement therapy. In this paper we compare the neurogenic potential of MSCs isolated from bone marrow (BMSC), subcutaneous adipose tissue (AD MSC) and menstrual blood (eMSC). It was found that the native eMSCs, BMSCs and AD MSCs express neuronal marker β -III-tubulin with a frequency of 90, 50 and 14 %, respectively. We also showed that eMSCs have a high endogenous level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), whereas the BMSCs and the AD MSCs are characterized by low basal BDNF levels. As induction of neuronal differentiation in the studied MSCs using differentiation medium containing B27 and N2 supplements, 5-azacytidine, retinoic acid, IBMX and dbcAMF caused changes in the cells morphology, the increased expression of β -III-tubulin, and the appearance of neuronal markers GFAP, NF-H, NeuN and MAP2. BDNF secretion during differentiation was significantly enhanced in the BMSCs and decreased in the eMSCs cultures. However, no correlation between the basal and induced levels of the neuronal markers expression and BDNF secretion in the studied MSCs has been established.

Key words: cell therapy, mesenchymal stem cells, neurotrophic factors.