

DOI: 10.7868/S0041377118090084

## АНАЛИЗ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ПРОЦЕССЕ ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЛИНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА

© *И. В. Воронкина,\* Л. В. Смагина, И. И. Гин, Т. А. Крылова, А. С. Мусорина, Г. Г. Полянская*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;*

*\* электронный адрес: voronirina@list.ru*

С целью изучения механизмов дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека проведено исследование динамики активностей матриксных металлопротеиназ (ММП) 1, 2, 8, 9 и 13, экспрессии маркеров хондрогенеза (коллагена II типа и агрекана) и некоторых компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в процессе хондрогенеза клеточной линии MSCWJ-1, выделенной из Вартонова студня пупочного канатика, и изначально представленной монослойной (2D) культурой и клеточными сфероидными (3D). Анализ обоих вариантов линии MSCWJ-1 при культивировании в индукционной среде в течение 21 сут в культуре микромасс показал наличие хондрогенной дифференцировки. Тем не менее в 3D-культуре процесс хондрогенеза был более интенсивным, чем в монослойной (2D) культуре. Сравнительный анализ активности ММП свидетельствует о снижении активности ММП-1, -2 и -9 в процессе дифференцировки, но характер снижения у этих ММП различен. Экспрессия маркеров хондрогенеза (коллагена II типа и агрекана) значительно увеличивается в процессе дифференцировки в течение 21 сут в 2D- и 3D-вариантах линии MSCWJ-1. Одновременно анализировали содержание в лизатах клеток и кондиционированной среде таких компонентов ВКМ, как коллаген I типа, хондроитинсульфат (ХС) и декорин. При этом количество коллагена I типа и ХС снижалось в процессе дифференцировки, а количество декорина, наоборот, значительно увеличивалось. Показано, что клетки линии MSCWJ-1 при индукции хондрогенной дифференцировки кроме маркеров хондрогенеза синтезируют также коллаген I типа и декорин, что характерно для волокнистого хряща.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, хондрогенная дифференцировка, матриксные металлопротеиназы, внеклеточный матрикс, коллаген, агрекан, декорин, хондроитинсульфат

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, ММП — матриксные металлопротеиназы, МСК — мезенхимные стволовые клетки, ХС — хондроитинсульфат, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека, выделенные из разных тканей, широко используются для решения фундаментальных проблем клеточной биологии, а также для прикладных исследований в клеточной терапии и в качестве тест-систем для фармацевтических исследований (Zhang et al., 2012; Sharma et al., 2014; Hendijani, 2017). В настоящее время актуальными задачами клеточной биологии являются выделение и сравнительная характеристика МСК человека, полученных из разных источников. Происхождение или источник получения МСК может определять их функциональные характеристики, которые, в частности, зависят от свойственного каждой ткани микроокружения. Тем не менее, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК разного происхождения определяется рядом общих характеристик. К таким характеристикам относятся следующие: адгезивность к культуральному

пластику, активная пролиферация, экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD44, HLA ABC и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA DR, способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях (Dominici, 2006; Sensebe et al., 2010).

Существенным направлением при изучении биологии МСК является исследование механизмов мультипотентной дифференцировки и функциональные особенности МСК, в частности выяснение роли матриксных металлопротеиназ (ММП). ММП и их специфические ингибиторы влияют на фундаментальные клеточные процессы, в частности на пролиферацию, апоптоз и дифференцировку. ММП участвуют в процессах ремоделирования тканей и развития органов, специфически модулируя сигнальные пути посредством взаимодействия с субстратами разной природы и путем перестройки внеклеточ-

ного матрикса (ВКМ). ВКМ подлежит постоянному обновлению за счет процессов синтеза и деградации. Основную роль в этих процессах играют ММП, способные расщеплять все белки ВКМ. ВКМ является одним из важнейших регуляторов клеточных процессов. Регуляция процессов дифференцировки осуществляется через взаимодействие вырабатываемых самими клетками белков ВКМ и ММП (Nagase, Woessner, 1999; Page-McCaw et al., 2007; Kessenbrock et al., 2010).

Активное участие ММП в регуляции дифференцировки МСК в разных направлениях убедительно проанализировано в ряде работ (Mannello et al., 2006; Bertram et al., 2009; Ghajar et al., 2010; Schneider et al., 2010; Polacek et al., 2011; Sillat et al., 2012; Ould-Yahoui et al., 2013; Sassoli et al., 2014; Tratwal et al., 2015). Ранее нами показано наличие активностей ММП-1, ММП-2 и ММП-9 в процессе дифференцировки в адипогенном и остеогенном направлениях в линиях МСК, выделенных из костного мозга (FetMSC) и зачатка конечности (M-FetMSC) одного донора — раннего эмбриона человека. Сравнительный анализ динамики активностей этих ММП в процессе обеих дифференцировок показал, в частности, различия между монослойными культурами (2D-вариант) и полученными из них клеточными сфероидными (3D-вариант) (Воронкина и др., 2016).

В настоящее время широко исследуются клеточные сфероиды, полученные из МСК разного происхождения. Это связано с тем, что условия 3D-культивирования МСК гораздо ближе к физиологическим условиям тканей в организме, чем монослойное (2D) культивирование. В клеточных сфероидах усилены межклеточные взаимодействия и взаимодействие клеток с ВКМ, что расширяет возможности изучения природных клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, в отсутствие экзогенных (искусственных) матриксов, которые могут препятствовать проявлению этих свойств (Baraniak et al., 2012; Dan et al., 2017). Клеточные сфероиды МСК обладают усиленным противовоспалительным действием, увеличенным дифференцировочным потенциалом и увеличенной экспрессией ряда цитокинов и плюрипотентных генов по сравнению с монослойными культурами. Таким образом, они являются перспективным клеточным материалом как для исследования основ органогенеза, так и для использования их в регенеративной медицине (Alimperti et al., 2014; Bogdanova-Jatniece et al., 2014; Guo et al., 2014; Крылова и др., 2015; Li et al., 2015; Murphy et al., 2017).

Надо подчеркнуть, что в настоящее время мировой проблемой являются поиск и оптимизация возможностей восстановления дегенеративных изменений суставного хряща у человека, возникающих в процессе старения организма. Поэтому изучение механизмов хондрогенной дифференцировки существенно для успешного использования хондроцитов в регенерации хряща (Kim et al., 2013; Tanthalsong et al., 2017). Из данных литературы следует, что в процессе хондрогенной дифференцировки принимают участие несколько ММП: ММП-1, -2, -8, -9, -10, -11 и -13, а также показаны изменения динамики активности ММП в процессе этой дифференцировки (Shlupov et al., 1999; Wu et al., 2002; Bertram et al., 2009). Тем не менее известно немного работ по изучению хондрогенеза в сфероидах, полученных из МСК человека (Arufe et al., 2009, 2011; Huang et al., 2011; Xu et al., 2016).

Таким образом, задача настоящей работы состояла в анализе динамики активности ММП в процессе хондрогенной дифференцировки во вновь полученной и охарак-

теризованной линии МСК (MSCWJ-1), выделенной из Вартонова студня пупочного канатика человека (Крылова и др., 2017). Для этого в монослойной (2D) культуре и полученной из нее 3D-культуре (в клеточных сфероидах) клеток MSCWJ-1 сравнительно анализировали: 1) хондрогенную дифференцировку в культуре микромасс в течение 21 сут после ее индукции; 2) активность ММП-1, -2, -8, -9 и -13 в процессе дифференцировки; 3) экспрессию маркеров хондрогенеза (коллагена II типа и аггрекана); 4) экспрессию компонентов ВКМ — коллагена I типа, хондроитинсульфата (ХС) и декорина.

## Материал и методика

В работе использовали полученную в ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) клеточную линию MSCWJ-1. Методы получения и характеристика этой линии описаны ранее (Крылова и др., 2017).

Клетки монослойной культуры MSCWJ-1 (2D-культура) и полученные из нее сфероиды (3D-культура) культивировали в ростовой среде, содержащей 90 % DMEM/F12 (Gibco-Invitrogen, США) и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), в условиях 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C и влажности 90 %. Среду меняли каждые 2—3 сут. Для получения сфероидов суспензию клеток на 6-м пассаже после декриоконсервации помещали в чашки Петри (174932, Thermo Scientific, США) в концентрации  $2 \cdot 10^5$  кл./мл на 24—48 ч. Поверхность Sphera™ этих чашек способствует образованию и длительному поддержанию клеточных сфероидов в неадгезивном состоянии (Крылова и др., 2015). В данном исследовании клеточные линии использовали на 6-м пассаже после получения, а клеточные сфероиды — через 48 ч после их образования (рис. 1).

Направленную дифференцировку в хондрогенном направлении проводили в культуре микромасс по модифицированному методу (Reyes et al., 2001). Для этого клетки MSCWJ-1 в 2D-культуре снимали с поверхности флакона смесью трипсина с версеном (Gibco, США), добавляли среду с сывороткой и полученную суспензию, а также суспензию клеточных сфероидов (3D-культура) центрифугировали при 800 об/мин 5 мин. К осадку добавляли бессывороточную среду и осаждали в конической пробирке. Конечное число клеток в пробирке составляло  $1 \cdot 10^6$ . Затем осторожно отбирали среду и добавляли 0.5 мл хондрогенной индукционной среды (AdvanceSTEM Chondrogenic Differentiation Medium, Thermo Scientific HyClone Product, США). Индукцию дифференцировки проводили в течение 21 сут. Среду меняли через каждые 3—4 сут. Сульфатированные гликозаминогликаны в процессе хондрогенной дифференцировки идентифицировали по окраске 1%-ным раствором толуидинового синего в 50%-ном изопропанол (MP Biomedicals, США); протеогликианы идентифицировали по окраске 0.1%-ным раствором сафранина О (Merck, Германия). Время окраски составляло 30 мин при комнатной температуре. Для морфологической оценки степени дифференцировки проводили фиксацию и окрашивание клеток через 3, 12 и 21 сут после начала индукции. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия).

Для проведения биохимического анализа клетки центрифугировали, отбирали кондиционированную среду и

все оставшиеся в пробирке клетки лизировали, после чего полученный клеточный лизат использовали для электрофоретического анализа. Из собранной среды также готовили пробы для зимографии и электрофореза (рис. 2). Эксперименты повторяли 5 раз и полученные данные усредняли. Пробы собирали через 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 21 сут после введения дифференцировочной среды. Контролем для зимографии служили пробы кондиционированной ростовой среды, собранные перед заменой на индукционную, а также пробы интактной хондрогенной индукционной среды.

**Зимография.** Метод использовали для определения ММП в кондиционированной клетками среде. Пробы выдерживали в буфере для проб (62.5 мМ Трис-НСl и 0.1 % SDS, pH 6.8) и анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии 0.5 мг/мл желатина или 1.0 мг/мл казеина в разделяющем геле. Пробы наносили на гель в количестве, соответствующем 20 мкг белка на дорожку. Количество белка в пробе определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). После окончания электрофореза гель отмывали 2.5%-ным раствором Тритона X-100 и инкубировали в буфере, содержащем 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 50 мМ Трис-НСl, pH 7.4, при 37 °С для ренатурации протеаз и протеолитического расщепления субстрата. После инкубации гель фиксировали и окрашивали Кумасси G-250 (Sigma-Aldrich, США). Присутствие ММП, расщепляющих желатин или коллаген, определяли по наличию неокрашенных полос на геле (Oliver et al., 1999). Для проведения количественного анализа гели сканировали и полученные изображения обрабатывали с помощью программы QuantiScan (версия 3.0), при этом величину активности ММП получали в усл. ед., принятых в программу QuantiScan (произведение числа окрашенных пикселей на интенсивность их окраски). Наличие ММП подтверждали с помощью Вестерн-блот-анализа. На графиках приведены средние значения и их ошибки по 3 измерениям в каждой точке (рис. 3, а, б). Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.01$ .

**Электрофорез белков и Вестерн-блот-анализ.** Электрофорез проводили по стандартному протоколу (Laemmli, 1970) в денатурирующих восстанавливающих условиях с использованием градиентных полиакриламидных гелей (4—15 %). При анализе содержания агрекана пробы обрабатывали хондроитиназой для удаления хондроитинсульфатных цепей и идентификации антителами корового белка агрекана. В пробы добавляли 4-кратный буфер по Лэммли при соотношении пробы и буфера 3 : 1 и нагревали 5 мин при 100 °С. В лунки наносили по 20 мкл лизатов клеток и по 25 мкл кондиционированных сред. После окончания электрофореза проводили перенос белков с гелей на нитроцеллюлозные мембраны в системе Mini Trans-Blot Cell (BioRad, США). После этого мембраны промывали буфером Т-PBS (PBS, содержащий 0.05 % Tween 20) и инкубировали в блокирующем буфере в течение 1 ч. Затем мембраны инкубировали с первичными антителами против коллагена I типа (AB745; Chemicon, США), коллагена II типа (ab3092; Abcam, Великобритания), агрекана (bs-11655; Bioss, США) и  $\beta$ -актина (ab8226; Abcam, Великобритания) в течение ночи при 4 °С в блокирующем буфере. Далее мембраны отмывали в Т-PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере, содержащем вторичные антитела с HRP (31431; Thermo Scientific,

США, или A0545; Sigma, Германия). После отмывки от вторичных антител в Т-PBS и PBS проводили детектирование связавшихся антител методом хемилюминесценции с помощью субстрата SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095; Thermo Scientific, США) на приборе Chemidoc (Bio-Rad, США). Полученные цифровые изображения анализировали с помощью программы Quantiscan для проведения денситометрии окрашенных белковых пятен.

**Дот-блот.** Пробы чистой кондиционированной среды и пробы клеточных лизатов, смешанных с денатурирующим буфером Лэммли, наносили на нитроцеллюлозную мембрану по 2.5 мкл на пятно, после высушивания мембраны на воздухе дополнительно наносили еще по 2.5 мкл пробы на пятно. Мембраны промывали буфером Т-PBS и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере, содержащем Т-PBS и 5%-ное обезжиренное молоко. Затем мембраны инкубировали с первичными антителами против декорина (sc-22753; Santa Cruz, США) или ХС (C8035; Sigma, Германия) в течение ночи при 4 °С в блокирующем буфере. Далее проводили те же процедуры, что и при Вестерн-блоттинге. Полученные цифровые изображения тоже анализировали с помощью программы Quantiscan для проведения денситометрии окрашенных белковых пятен.

## Результаты и обсуждение

Проведен морфологический анализ монослойных 2D-культур и клеточных сфероидов (3D). Показано, что монослойные клеточные популяции, постоянно культивируемые в условиях 2D, состоят из вытянутых фибробластоподобных клеток (рис. 1, а). Клеточные сфероиды представляют собой плотные округлые образования с гладкими краями (рис. 1, б).

Культивирование клеток в хондрогенной среде приводило к образованию структур, которые выявляются с помощью окрашивания толуидиновым синим (идентификация сульфатированных гликозаминогликанов) и сафранином О (идентификация протеогликанов). При культивировании в индукционной хондрогенной среде культуры микромаст в течение 21 сут показан активный хондрогенез в обоих вариантах (2D и 3D), но между ними есть ряд различий (рис. 2). Так, в 2D-культуре при окрашивании толуидиновым синим через 3 сут культивирования наблюдается слабое голубое окрашивание агрегатов больших округлых клеток. Элементы ВКМ не выявляются (рис. 2). К 12-м сут культивирования увеличивается доля интенсивно окрашенных хондрогенных структур, уменьшается доля недифференцированных крупных клеток, а на 21-е сут дифференцировки формируются многочисленные интенсивно окрашенные в синий цвет хондрогенные структуры, накапливаются белки ВКМ (рис. 2).

При культивировании сфероидов (3D-культура) в тех же условиях уже на 3-и сут наблюдается интенсивное синее окрашивание хондрогенных структур при небольшом числе слабоокрашенных недифференцированных клеток (рис. 2, окрашены толуидиновым синим). На 12-е и 21-е сут дифференцировки идет более активное формирование хондрогенных структур и накопление белков ВКМ (рис. 2). При окрашивании сафранином О в обоих вариантах клеток также наблюдается усиление окраски в процессе хондрогенной дифференцировки в течение 21 сут.

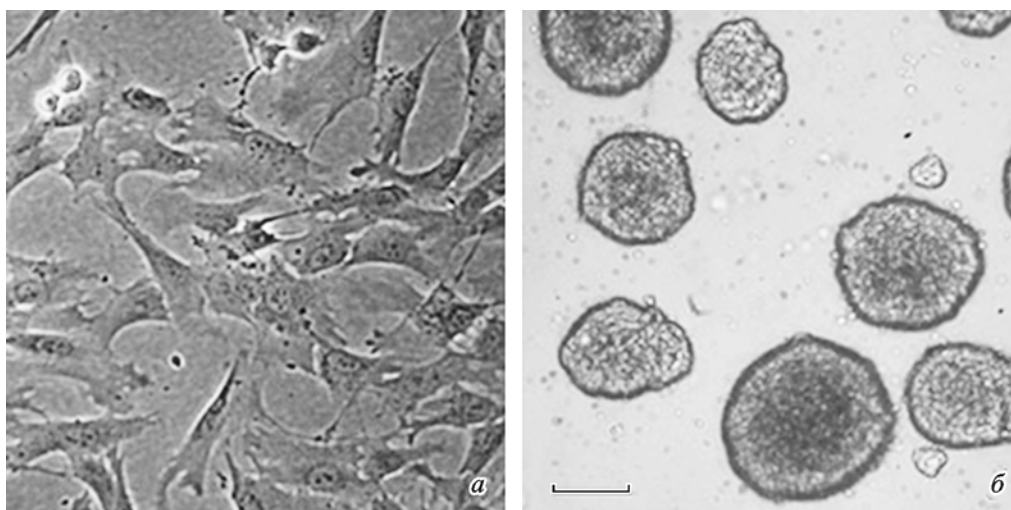


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеток линии MSCWJ-1 в монослойной 2D- культуре (а) и в клеточных сфероидсах 3D-культуры (б).

Масштабный отрезок — 100 мкм.

Но в 3D-культуре более активно формируются хондрогенные структуры (окрашены сафранином О, рис. 2). Таким образом, из полученных результатов следует, что в клеточных сфероидсах процесс хондрогенеза более активный, чем в 2D-культуре. Ранее рядом авторов было также показано расширение дифференцировочного потенциала клеточных сфероидов по сравнению с монослойными культурами (Frith et al., 2010; Huang et al., 2011; Guo et al., 2014; Murphy et al., 2014; Крылова и др., 2015).

Сравнительный анализ активности ММП свидетельствует о снижении активности ММП-1, -2 и -9 в процессе дифференцировки, но характер снижения различен (рис. 3). Интактная дифференцировочная среда не содержит ММП (так как не содержит сыворотки), соответственно все изменения уровней активности ММП происходят за счет клеток, находящихся в этой среде (рис. 3, в). Так, активность ММП-2 в 2D- и 3D-культурах существенно увеличивается к 3-м сут (4681 ± 561 и

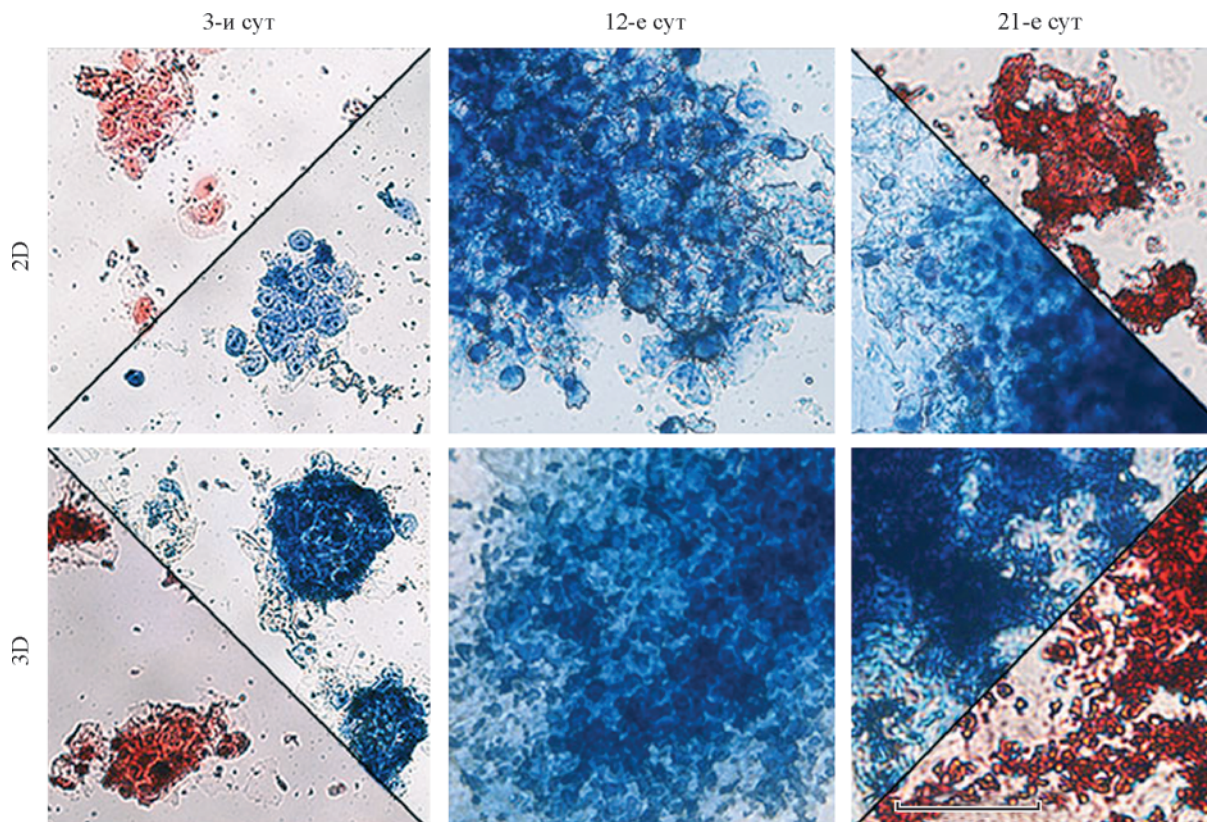


Рис. 2. Дифференцировка монослойных культур (2D) и клеточных сфероидов (3D) линии MSCWJ-1 в хондрогенном направлении.

Окрашивание толуидиновым синим (3, 12 и 21-е сут, синий цвет) и сафранином О (3-и и 21-е сут, красный цвет). Масштабный отрезок — 50 мкм.

3434 ± 412 усл. ед. на 3-и сут по сравнению с кондиционированной средой до начала индукции — 2005 ± 197 и 1556 ± 147 усл. ед.), а затем начинает постепенно снижаться. Причем более активное снижение имеет место в 3D-культуре, которое к 21-м сут приближается к нулевой отметке, тогда как в 2D-культуре активность ММП-2 еще присутствует. Активность ММП-9 в обоих случаях (2D и 3D), подобно ММП-2, увеличивается в течение 3 сут (2248 ± 227 и 2179 ± 326 усл. ед. для 2D и 3D соответственно) по сравнению с кондиционированной средой до начала индукции (1710 ± 102 и 1434 ± 85 усл. ед. соответственно), а затем резко снижается к 9-м сут (64 ± 9 и 21 ± 3 усл. ед. соответственно). В 3D-культуре происходит более существенное снижение, чем в 2D ( $P < 0.01$ ). В отличие от двух рассмотренных ММП (2 и 9) активность ММП-1 в обоих вариантах на 3-и сут находится на низком уровне (145 ± 17 и 111 ± 13 усл. ед. в 2D- и 3D-культурах соответственно). Окончательное исчезновение активности происходит к 12-м сут в культуре 2D и к 6-м сут — в 3D (рис. 3, а, б). Так как индукционная среда не содержит сыворотки, все указанные изменения в активности ММП при хондрогенезе связаны только с клеточными процессами. Возможно, что изменение спектра ММП связано с изменением синтеза или секреции компонентов ВКМ в процессе дифференцировки (Manello et al., 2006; Almalki et al., 2016).

Наличие ММП-8 и ММП-13 определяли с помощью Вестерн-блот-анализа, который показал их присутствие в среде, кондиционированной клетками, только на 3-и сут и практическое отсутствие их уже на 6-е сут дифференцировки. По сравнению с уровнями активности других ММП уровни активности ММП-8 и ММП-13 были очень незначительными (рис. 3, в).

Компоненты ВКМ расщепляются ММП в процессах ремоделирования ткани, эмбриогенеза, заживления ран и других процессах, требующих изменения микроокружения клеток. Субстратами исследованных нами ММП являются такие компоненты ВКМ, как коллагены I и II типов, агрекан и протеогликаны (Nagase, Woessner, 1999). Соответственно синтез и секреция этих компонентов ВКМ могут зависеть от присутствия ММП в среде культивирования клеток.

Маркерами хондрогенной дифференцировки являются коллаген II типа и агрекан. Результаты Вестерн-блота с антителами к агрекану и коллагену II типа показали, что эти компоненты появляются в лизатах клеток в значительном количестве на 9-е сут с дальнейшим увеличением к 21-м сут дифференцировки ( $P < 0.01$ ; рис. 4, а, б). При этом динамика накопления коллагена (рис. 4, а) и агрекана (рис. 4, б) для 2D- и 3D-культур статистически не различается. Таким образом, результаты свидетельствуют о наличии активной хондрогенной дифференцировки в течение 21 сут в обоих вариантах линии MSCWJ-1. Устойчивое присутствие этих маркеров (коллаген II типа и агрекан) в процессе хондрогенеза показано во многих работах (Huang et al., 2011; Calabrese et al., 2017; Goh et al., 2017; Merlin et al., 2017; Tanthalsong et al., 2017).

Продемонстрировано также, что МСК преимущественно синтезируют коллаген I типа, а экспрессия коллагена II типа и агрекана повышается после длительного культивирования (Chen et al., 2004). Экспрессия коллагена I типа может также быть маркером раннего хондрогенеза (Quintana, zur Nieden, 2009). Было сделано предположение, что в присутствии дифференцировочных факто-

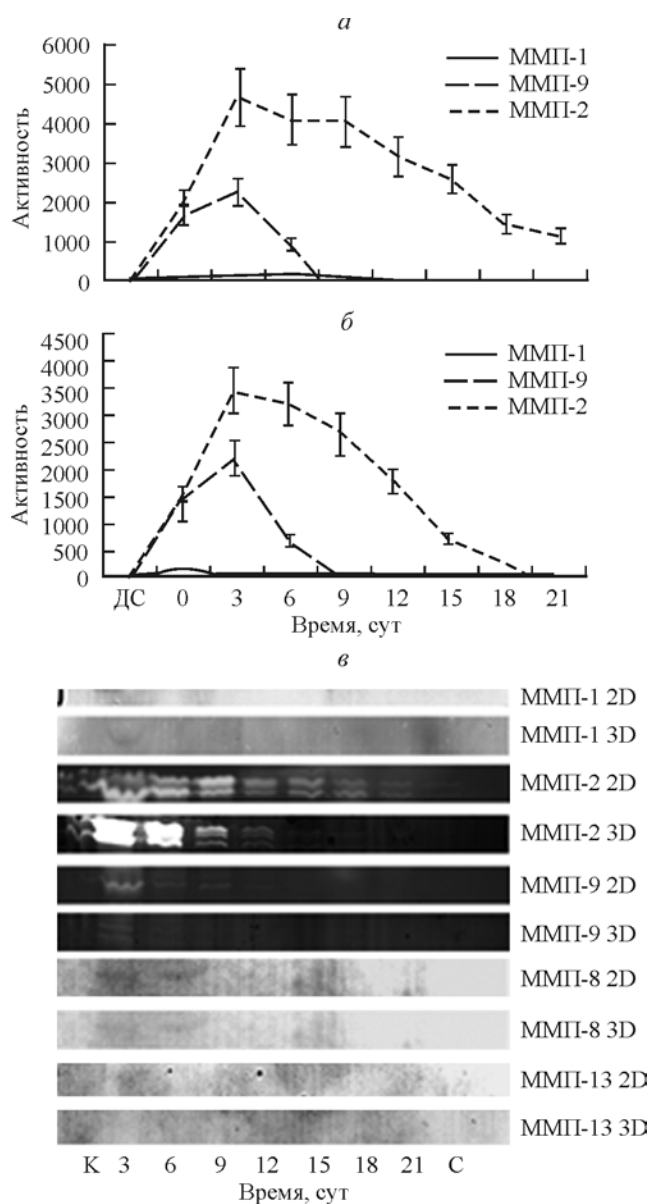


Рис. 3. Изменение активности ММП-1, ММП-2 и ММП-9 в кондиционированных средах в ходе хондрогенной дифференцировки МСК при 2D- (а) и 3D- (б) культивировании.

в — зимограммы и Вестерн-блоты идентифицированных ММП. С — дифференцировочная среда, 0 — кондиционированная среда клеток перед началом индукции. Активность ММП дана в усл. ед., принятых в программе QuantiScan.

ров для повышения экспрессии коллагена II типа и агрекана требуется более длительное время, чем в отсутствие этих факторов (Zhao, Detamore, 2010). Повышенная экспрессия коллагена I типа по отношению к коллагену II типа характерна для волокнистой хрящевой ткани (Müller et al., 2014).

Компоненты ВКМ, синтезируемые клетками в ходе дифференцировки, включают в себя не только агрекан и коллаген II типа, но и другие компоненты, характерные для хрящевой ткани, такие как декорин или коллаген I типа (Johnstone et al., 1998; Worster et al., 2001; Indrawattana et al., 2004). Коллаген I типа является распространенным белком в таких тканях, как кость, дерма и хрящ. Результаты определения коллагена I типа в лизатах клеток показали, что в 2D-культуре его количество

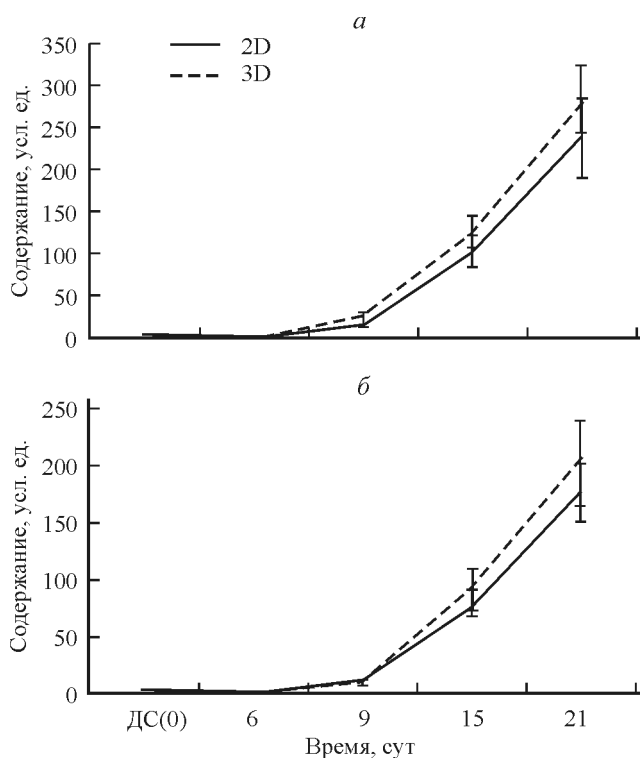


Рис. 4. Изменение содержания агрекана (а) и коллагена II типа (б) в лизатах клеток в ходе хондрогенной дифференцировки в 2D- и 3D-культурах.

По данным Вестерн-блот-анализа. ДС(0) — дифференцировочная среда.

снижалось в процессе дифференцировки (рис. 5, а, б). Это совпадает с данными других авторов, показавших, что коллаген I типа исчезает через 7 сут после образования трехмерных агрегатов (Johnstone et al., 1998). В 3D-культуре количество коллагена I типа после снижения к 9-м сут увеличивалось к 21-м сут (рис. 5, а, б). При этом контроль по содержанию  $\beta$ -актина в лизатах клеток показал, что в обоих вариантах количество  $\beta$ -актина в процессе дифференцировки снижалось через 21 сут до неидентифицируемого. При трехкратном проведении экспериментов снижение содержания  $\beta$ -актина к концу эксперимента повторялось и не зависело от способа сбора клеток при подготовке проб.

Окрашивание толуидиновым синим усиливается к 21-м сут дифференцировки (рис. 2). Это окрашивание обусловлено присутствием гликозаминогликанов, включающих в себя не только агрекан, но также ХС или декорин. Усиление окраски сафранином О также указывает на увеличение количества протеогликанов, в том числе ХС. Анализ содержания ХС показал его наличие и в интактной индукционной среде, и в лизатах клеток, и его количество постепенно снижается до неопределимого через 15 сут в обоих вариантах культивирования. При этом на 9-е сут наблюдается некоторое увеличение количества ХС в обоих случаях (рис. 5, в). На графиках показано изменение интенсивности окраски относительно  $\beta$ -актина в среде и лизатах клеток (рис. 5, з). В кондиционированной среде идет постепенное снижение количества ХС, а клеточные лизаты 2D- и 3D-культур на ранних сроках существенно различаются (рис. 5, в, з). В случае 3D-культивирования большое количество ХС присутствует уже в самом начале дифференцировки; по-видимому, сфероиды

имеют его в своем составе до начала дифференцировки.

Анализ на декорин показал, что в самой среде дифференцировки (AdvanceSTEM Chondrogenic Differentiation Medium, Thermo Scientific HyClone Product, США) уже содержится декорин. При этом если в случае 2D-культивирования содержание декорина в среде максимально в начале дифференцировки и снижается в течение 9 сут, то в сфероидах (3D) оно, наоборот, увеличивается в среде в течение 15 сут, после чего немного снижается к 21-м сут. В клеточных лизатах 2D-культуры содержание декорина остается на уровне интактной среды, а в лизатах 3D-культуры существенно увеличивается к 21-м сут (рис. 5, д). На графике показана интенсивность окраски относительно  $\beta$ -актина в лизатах клеток (рис. 5, е). Можно видеть, что различия между кондиционированной средой 2D- и 3D-культур начинаются на 9-е сут. В случае сфероидов уменьшение количества декорина в среде коррелирует с его увеличением в лизатах клеток, что может указывать на его переход в состав ВКМ, окружающего клетки.

По данным литературы, декорин присутствует в веществе хряща, участвует во взаимодействиях между клетками, а также в связывании коллагенов I и II типов. Локализация декорина совпадает с расположением коллагенов (Barry et al., 2001). Декорин известен как секретируемый протеогликан, экспрессируемый широким кругом тканей мезенхимного происхождения, включая опухолевую строму, но не трансформированными клетками. Декорин содержит одну дерматансульфатную, но не ХС-цепь, и окраска на протеогликаны данной линии клеток обусловлена, видимо, присутствием декорина больше, чем ХС, который исчезает в процессе дифференцировки.

Полученные результаты показывают, что клетки линии MSCWJ-1 секретируют коллаген II типа и агрекан, ММП-2 и ММП-9, а также некоторое количество ММП-1. Количество ММП-8 и ММП-13 у этих клеток очень незначительны. В ходе дифференцировки клетки секретируют декорин. Из полученных данных можно сделать вывод, что ХС, накопленный в клетках в течение культивирования до начала дифференцировки, при переводе в индукционную среду расходуется и более не синтезируется. Декорин же, напротив, накапливается в среде, а также в клетках по мере дифференцировки. Это совпадает с результатами окрашивания на гликозаминогликаны. По-видимому, клетки линии MSCWJ-1 дифференцируются в сторону образования волокнистой хрящевой ткани, а не образования гиалинового хряща, что подтверждается результатами изучения динамики синтеза коллагенов I и II типов.

В настоящей работе показано, что активный хондрогенез продолжается 18 сут, затем процесс начинает замедляться. К 21-м сут процесс, по-видимому, останавливается, клетки начинают деградировать. Тем не менее окраска толуидиновым синим и сафранином О сохраняется. Возможно, это связано с наличием вокруг клеток или на мембранах белка декорина, а также с еще неполной деградацией клеток. Было показано, что при выделении МСК из синовиальных мембран коленного сустава хондрогенез длится гораздо дольше (до 46 сут), при этом клетки (хондроциты) остаются живыми (Agufe et al., 2009). Возможно, это связано с микроокружением, которое изначально воздействовало на клетки именно в направлении хондрогенеза (Djouad et al., 2007). В частности, обнаружены различия по интенсивности адипогенной

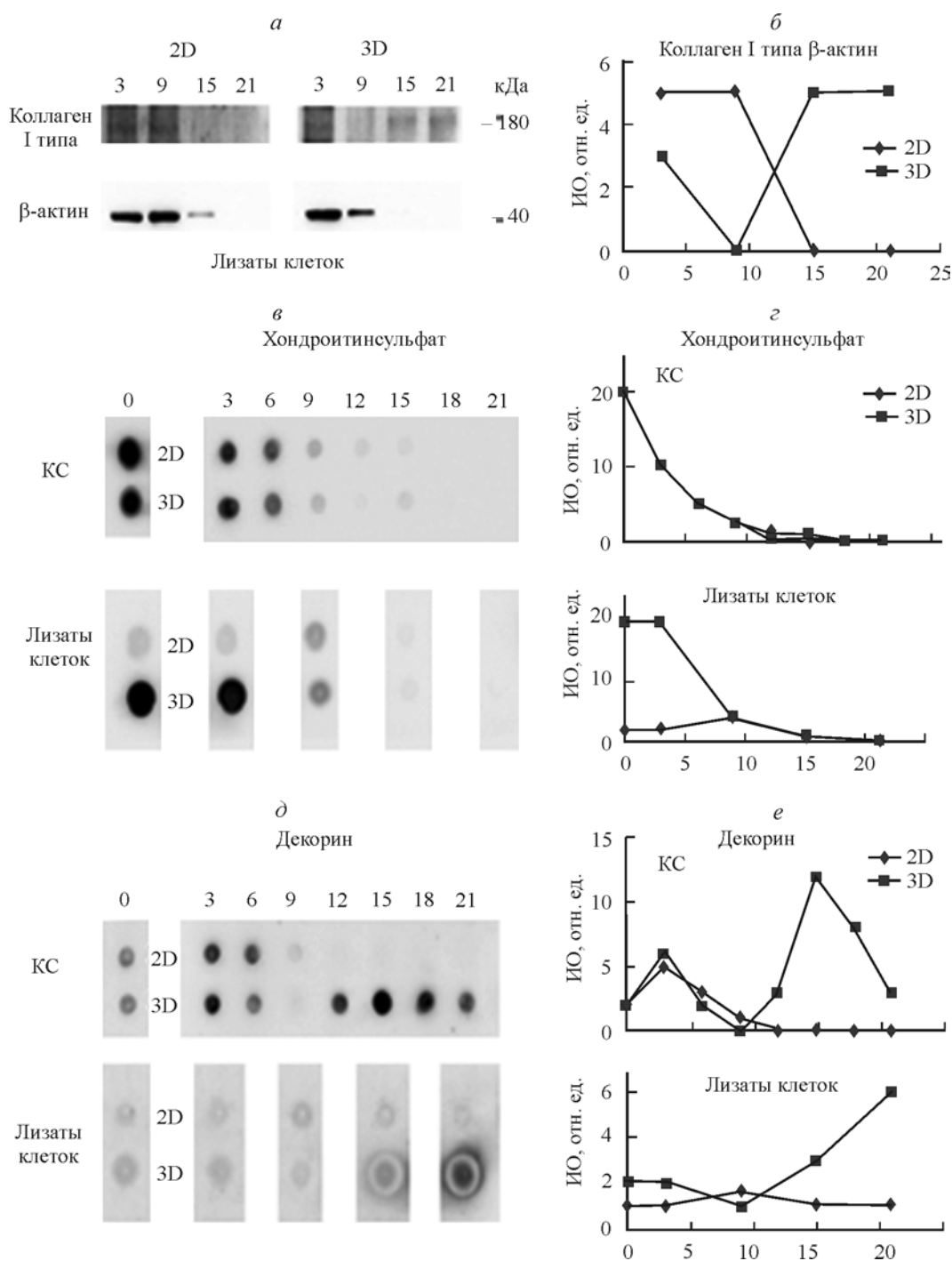


Рис. 5. Изменение содержания коллагена I типа и β-актина (а, б), хондроитинсульфата (в, г) и декорина (д, е) в кондиционированных средах (КС) и лизатах клеток в ходе хондрогенной дифференцировки МСК в 2D- и 3D-культурах.

а — Вестерн-блот; в, д — дот-блот; б, г, е — результаты денситометрии. По оси абсцисс — время от момента перевода клеток в хондрогенную дифференцировочную среду, сут. ИО — интенсивность окраски.

дифференцировки между двумя линиями, полученными от одного донора, но из разных тканей (Крылова и др., 2014). Разная степень дифференцировки в трех направлениях, характеризующих статус МСК, показана и в других исследованиях. Например, при сравнении МСК из костного мозга (BM-MSC) и из Вартонова студня (WJ-MSC) показаны значительно большая пролиферативная активность у WJ-MSC и более высокий остеогенный дифференцировочный потенциал у BM-MSC (Hsieh et al., 2010;

Amable et al., 2014). В ряде исследований наблюдали зависимость дифференцировочного потенциала от длительности культивирования МСК (Park et al., 2005; Bonab et al., 2006; Lo Surdo et al., 2013; Кольцова и др., 2017; Bianchi et al., 2017).

Надо подчеркнуть, что линии МСК, выделенные из разных источников, несмотря на общность ряда свойств, имеют межлинейные различия по степени выраженности той или иной характеристики. Кроме того, многие МСК,

полученные из взрослых и эмбриональных тканей, имеют ограниченное применение из-за инвазивного способа их получения, малого количества полученных клеток в связи с невысоким пролиферативным потенциалом или из-за этических проблем (Bongso, Fong, 2013). В связи с этим большое внимание уделяется выделению МСК из внезародышевых органов, которые формируются в первые недели беременности, а получение МСК из этих органов не связано с перечисленными ограничениями. В частности, клетки, выделенные из Вартонова студня пупочного канатика человека, по сравнению с МСК из других источников имеют высокую пролиферативную активность, расширенный дифференцировочный потенциал до поздних пассажей при сохранении кариотипической стабильности, проявляют дифференцировочную пластичность, экспрессируя ряд эндодермальных и эктодермальных маркеров, обладают высоким уровнем экспрессии тумор-супрессорных генов и низкой иммуногенностью (Hsieh et al., 2010; Nekanti et al., 2010; Fong et al., 2011; Gauthaman et al., 2012; Bongso, Fong, 2013; Lian et al., 2016; Wang et al., 2016; Крылова и др., 2017). В связи с рядом преимуществ этих клеток для регенеративной медицины становится необходимым изучение процессов, проходящих при дифференцировке, в частности при хондрогенезе, для различных линий клеток МСК.

### Список литературы

- Воронкина И. В., Смагина Л. В., Крылова Т. А., Мусорина А. С., Полянская Г. Г. 2016. Сравнительный анализ динамики активности матриксных металлопротеиназ в процессе дифференцировки мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из разных тканей одного донора. Цитология. 58 (11) : 865—874. (Voronkina I. V., Smagina L. V., Krylova T. A., Musorina A. S., Poljanskaya G. G. 2016. Comparative analysis of matrix metalloproteinases activity during differentiation of mesenchymal stem cell lines isolated from different tissues from one donor. Tsitologiya. 58 (11) : 865—874.)
- Кольцова А. М., Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2017. Динамика свойств двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека, при длительном культивировании. Цитология. 59 (9) : 574—587. (Koltsova A. M., Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Turilova V. I., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2017. Dynamics properties of two lines of mesenchymal stem cells, derived from the Wharton's jelly of the human umbilical cord, during long-term cultivation. Tsitologiya. 59 (9) : 574—587.)
- Крылова Т. А., Кольцова А. М., Мусорина А. С., Зенин В. В., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2017. Характеристика двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека. Цитология. 59 (5) : 315—327. (Krylova T. A., Koltsova A. M., Musorina A. S., Zenin V. V., Turilova V. I., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2017. Derivation and characteristic of two lines of human mesenchymal stem cells, generated from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Tsitologiya. 59 (5) : 315—327.)
- Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Полянская Г. Г. 2015. Характеристика клеточных сфероидов, полученных из линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 57 (7) : 480—490. (Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Poljanskaya G. G. 2015. Cellular spheroids obtained from mesenchymal stem cells derived from bone marrow and limb muscle of early human embryo. Tsitologiya. 57 (7) : 480—490.)
- Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2014. Сравнительные характеристики линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга и мышцы конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 56 (8) : 562—573. (Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2014. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells lines derived from bone marrow and muscle of limb of early human embryo. Tsitologiya. 56 (8) : 562—573.)
- Alimperti S., Lei P., Wen Y., Tian J., Campbell A. M., Andreadis S. T. 2014. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. Biotechnol. Prog. 30 : 974—983.
- Almalki S. G., Agrawal D. K. 2016. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. Stem Cell Res. Ther. 7 : 129.
- Amable P. R., Teixeira M. V. T., Carias R. B. V., Granjeiro J. M., Borojevic R. 2014. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. Stem Cell Res. Ther. 5 : 53.
- Arufe M. C., De la Fuente A., Fuentes-Boquete I., De Toro F., Blanco F. J. 2009. Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. J. Cell. Biochem. 108 : 145—155.
- Arufe M. C., De la Fuente A., Mateos J., Fuentes I., De Toro F. J., Blanco F. J. 2011. Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. Stem Cells Develop. 20 : 199—212.
- Baraniak P. R., McDevitt T. C. 2012. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. Cell Tissue Res. 347 : 701—711.
- Barry F., Boynton R. E., Liu B., Murphy J. M. 2001. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. Exp. Cell Res. 268 : 189—200.
- Bertram H., Boeuf S., Wachters J., Boehmer S., Heisel C., Hofmann M. W., Piecha D., Richter W. 2009. Matrix metalloprotease inhibitors suppress initiation and progression of chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells *in vitro*. Stem Cells Develop. 18 : 881—892.
- Bianchi M. V., Awaja F., Altankov G. 2017. Dynamic adhesive environment alters the differentiation potential of young and ageing mesenchymal stem cells. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 78 : 467—474.
- Bogdanova-Jatniece A., Berzins U., Kozlovskaya T. 2014. Growth properties and pluripotency marker expression of spontaneously formed three-dimensional aggregates of human adipose-derived stem cells. Int. J. Stem Cells. 7 : 143—152.
- Bonab M. M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari S. H., Ghavamzadeh A., Nikbin B. 2006. King of mesenchymal stem cell *in vitro*. BMC Cell Biol. 7 : 14. Doi: 10.1186/1471-2121-7-14.
- Bongso A., Fong C. Y. 2013. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cell Rev. 9 : 226—240.
- Bradford M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Calabrese G., Forte S., Gulino R., Cefali F., Figallo E., Salvatorelli L., Maniscalchi E. T., Angelico G., Parenti R., Gulisano M., Memeo L., Giuffrida R. 2017. Combination of collagen-based scaffold and bioactive factors induces adipose-derived mesenchymal stem cells chondrogenic differentiation *in vitro*. Front Physiol. 8 : 50. Doi: 10.3389/fphys.2017.00050. eCollection 2017.
- Chen G., Liu D., Tadokoro M. 2004. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in a cobweb-like biodegradable scaffold. Biochem. Biophys. Res. Commun. 322 : 50—55.
- Dan P., Velot É., Francius G., Menu P., Decot V. 2017. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: an untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. Acta Biomater. 48 : 227—237.
- Djouad F., Delorme B., Maurice M., Bony C., Apparailly F., Louis-Plence P., Jorgensen C. 2007. Microenvironmental changes



during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 9 : R33.

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.

Fong C. Y., Chak L. L., Biswas A., Tan J. H., Gauthaman K., Chan W. K., Bongso A. 2011. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* 7 : 1—16.

Frith J. E., Thomson B., Genever P. G. 2010. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Eng. (C) Methods.* 16 : 735—749.

Gauthaman K., Fong C. Y., Suganya C. A., Subramanian A., Biswas A., Choolani M., Bongso A. 2012. Extra-embryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online.* 24 : 235—246.

Ghajar C. M., Kachgal S., Kniazeva E., Mori H., Costes S. V., George S. C., Putnam A. J. 2010. Mesenchymal cells stimulate capillary morphogenesis via distinct proteolytic mechanisms. *Exp. Cell Res.* 316 : 813—825.

Goh B. S., Che Omar S. N., Ubaidah M. A., Saim L., Sulaiman S., Chua K. H. 2017. Chondrogenesis of human adipose derived stem cells for future microtia repair using co-culture technique. *Acta Otolaryngol.* 137 (4) : 432—441.

Guo L., Zhou Y., Wang S., Wu Y. 2014. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J. Cell Mol. Med.* 18 : 2009—2019.

Hendijani F. 2017. Explant culture: an advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif.* 50 (2). Doi: 10.1111/cpr.12334.

Hsieh J. Y., Fu Y. S., Chang S. J., Tsiang Y. H., Wang H. W. 2010. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem Cells Develop.* 19 : 1895—1910.

Huang G. S., Dai L. G., Yen B. L., Hsu S. H. 2011. Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. *Biomaterials.* 32 (29) : 6929—6945.

Indrawattana N., Chen G., Tadokoro M., Shann L. H., Ohgushi H., Tateishi T., Bunyaratvej A. 2004. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (3) : 914—919.

Johnstone B., Hering T. M., Caplan A. I., Goldberg V. M., Yoo J. U. 1998. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 238 (1) : 265—272.

Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 141 : 52—67.

Kim D. W., Staples M., Shinozuka K., Pantcheva P., Kang S. D., Borlongan C. V. 2013. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int. J. Mol. Sci.* 14 : 11 692—11 712.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 (5259) : 680—685.

Li Y., Guo G., Li L., Chen F., Bao J., Shi Y. J., Bu H. 2015. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell Tissue Res.* 360 : 297—307.

Lian J., Lv S., Liu C., Liu Y., Wang S., Guo X., Nan F., Yu H., He X., Sun G., Ma X. 2016. Effects of serial passage on the characteristics and cardiac and neural differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2016 : 9291013. Doi: 10.1155/2016/9291013.

Lo Surdo J. L., Millis B. A., Bauer S. R. 2013. Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic

differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 15 : 1527—1540.

Mannello F., Tonti G. A., Bagnara G. P., Papa S. 2006. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 24 : 475—481.

Merlin Rajesh Lal L. P., Suraishkumar G. K., Nair P. D. 2017. Chitosan-agarose scaffolds supports chondrogenesis of Human Wharton's Jelly mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 105 : 1845—1855.

Müller C., Khabut A., Dudhia J., Reinholt F. P., Aspberg A., Heinegård D., Önnnerfjord P. 2014. Quantitative proteomics at different depths in human articular cartilage reveals unique patterns of protein distribution. *Matrix Biol.* 40 : 34—45.

Murphy K. C., Fang S. Y., Leach J. K. 2014. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing. *Cell Tissue Res.* 357 : 91—99.

Murphy K. C., Whitehead J., Falahee P. C., Zhou D., Simon S. I., Leach J. K. 2017. Multifactorial experimental design to optimize the anti-inflammatory and proangiogenic potential of mesenchymal stem cell spheroids. *Stem Cells.* 35 : 1493—1504.

Nagase H., Woessner J. F. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274 : 21 491—21 494.

Nekanti U., Rao V. B., Bahirvani A. G., Jan M., Totey S., Ta M. 2010. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Develop.* 19 : 117—130.

Oliver G. W., Stettler-Stevenson W. G., Kleiner D. E. 1999. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. F. (Eds.). *Handbook of proteolytic enzymes.* San Diego: Acad. Press. 61—76.

Ould-Yahoui A., Sbai O., Baranger K., Bernard A., Gueye Y., Charrat E., Clement B., Gignes D., Dive V., Girard S. D., Féron F., Khrestchatsky M., Rivera S. 2013. Role of matrix metalloproteinases in migration and neurotrophic properties of nasal olfactory stem and ensheathing cells. *Cell Transplant.* 22 : 993—1010.

Quintana L., zur Nieden N. I., Semino C. E. 2009. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15 : 29—41.

Page-McCaw A., Ewald A. J., Werb Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 : 221—233.

Park J. S., Kim H. Y., Kim H. W., Chae G. N., Oh H. T., Park J. Y., Shim H., Seo M., Shin E. Y., Kim E. G., Park S. C., Kwak S. J. 2005. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. *Mech. Ageing Develop.* 126 : 551—559.

Polacek M., Bruun J. A., Elvenes J., Figenschau Y., Martinez I. 2011. The secretory profiles of cultured human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells: implications for autologous cell transplantation strategies. *Cell Transplant.* 20 : 1381—1393.

Reyes M., Lund T., Levik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C. M. 2001. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 98 : 2615—2625.

Sassoli C., Nosi D., Tani A., Chellini F., Mazzanti B., Quercio-li F., Zecchi-Orlandini S., Formigli L. 2014. Defining the role of mesenchymal stromal cells on the regulation of matrix metalloproteinases in skeletal muscle cells. *Exp Cell Res.* 323 : 297—313.

Schneider R. K., Puellen A., Kramann R., Raupach K., Bornemann J., Knuechel R., Perez-Bouza A., Neuss S. 2010. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials.* 31 : 467—480.

Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Gior-dano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 98 : 93—107.

Sharma S., Venkatesan V., Prakhya B. M., Bhonde R. 2014. Human mesenchymal stem cells as a novel platform for simultaneous evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals. *Mutagenesis*. geu086.

Shlopov B. V., Smith G. N., jr., Cole A. A., Hasty K. A. 1999. Differential patterns of response to doxycycline and transforming growth factor beta1 in the down-regulation of collagenases in osteoarthritic and normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 42 : 719—727.

Sillat T., Saat R., Pöllänen R., Hukkanen M., Takagi M., Kontinen Y. T. 2012. Basement membrane collagen type IV expression by human mesenchymal stem cells during adipogenic differentiation. *J. Cell. Mol. Med*. 16 : 1485—1495.

Tanthaisong P., Imsoonthornruksa S., Ngermsoungnern A., Ngermsoungnern P., Ketudat-Cairns M., Parnpai R. 2017. Enhanced chondrogenic differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells by GSK-3 inhibitors. *PLoS ONE*. 12 : e0168059. Doi: 10.1371/journal.pone.0168059. eCollection 2017.

Tratwal J., Mathiasen A. B., Juhl M., Brorsen S. K., Kastrop J., Ekblond A. 2015. Influence of vascular endothelial growth factor stimulation and serum deprivation on gene activation patterns of human adipose tissue-derived stromal cells. *Stem Cell Res. Ther*. 6 : 62—73.

Wang Q., Yang Q., Wang Z., Tong H., Ma L., Zhang Y., Shan F., Meng Y., Yuan Z. 2016. Comparative analysis of human

mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Wharton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum. Vaccin. Immunother*. 12 : 85—96.

Worster A. A., Brower-Toland B. D., Fortier L. A., Bent S. J., Williams J., Nixon A. J. 2001. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-β1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J. Orthopaedic Res*. 19 : 738—749.

Wu C. W., Tcheta E. V., Mwale F., Hasty K., Pidoux I., Reiner A., Chen J., Van Wart H. E., Poole A. R. 2002. Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *J. Bone Miner. Res*. 17 : 639—651.

Xu Y., Shi T., Xu A., Zhang L. 2016. 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney. *J. Cell. Mol. Med*. 20 : 1203—1213.

Zhang H., Zhang B., Tao Y., Cheng M., Hu J., Xu M., Chen H. 2012. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from whole human umbilical cord applying a single enzyme approach. *Cell Biochem. Funct*. 30 : 643—649.

Zhao L., Detamore M. S. 2010. Chondrogenic differentiation of stem cells in human umbilical cord stroma with PGA and PLLA scaffolds. *J. Biomed. Eng*. 3 : 1041—1049.

Поступила 10 V 2018

#### ANALYSIS OF MATRIX METALLOPROTEINASES ACTIVITY DYNAMICS DURING CHONDROGENIC DIFFERENTIATION PROCESS OF MESENCHYMAL STEM CELL LINE DERIVED FROM WHARTON'S JELLY OF HUMAN UMBILICAL CORD

I. V. Voronkina,\* L. V. Smagina, I. I. Gin, T. A. Krylova, A. S. Musorina, G. G. Poljanskaya

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

\* e-mail: voron@incras.ru

For newly obtained and characterized MSC line, isolated from the wharton's jelly of the human umbilical cord (MSCWJ-1) was fulfilled the analysis of chondrogenic differentiation in induction medium for 21 days in micromasses culture as well as comparative analysis of matrix metalloproteinases (MMP) -1, -2, -8, -9, -13 activities. The expression of chondrogenesis markers and some extracellular matrix (ECM) components (collagen type I, chondroitin sulfate, decorin) in monolayer culture (2D) and cell spheroid culture (3D) was also analysed. The results showed that the cells secrete collagen type II and aggrecan, MMP-2 and -9, as well as MMP-1, while the activity of MMP-8 and MMP-13 were negligible. The level of MMPs activity, as well as expression of ECM components, depended on 2D or 3D cultivation conditions. Unlike some literature data, a decrease in β-actin expression during the differentiation process was observed. The reason for the difference between the obtained data and the literature data can be due to experimental conditions, since in experiment differentiation was carried out in a serum-free medium. It was shown that MSCWJ-1 cell line additively to chondrogenesis markers synthesizes also collagen type I and decorin that was more characteristic for fibrous cartilage.

**Key words:** mesenchymal stem cells, chondrogenic differentiation, matrix metalloproteinases, extracellular matrix, collagen, aggrecan, decorin, chondroitin sulfate