

**ДЕСНА КАК ИСТОЧНИК АУТОЛОГИЧНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК
ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Н.В. Кошелева^{1,2,3}, И.М. Зурина^{1,3,4}, А.А. Горкун^{1,4}, П.Ю. Бикмулина⁴, А.А. Пулин⁵, И.Н. Сабурин^{1,3}

¹ *НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия*

² *МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

³ *Российская Медицинская Академия Непрерывного Профессионального Образования Минздрава РФ, Москва, Россия*

⁴ *Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия*

⁵ *НМЦХ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия*

ВВЕДЕНИЕ

Стволовые и прогениторные клетки, прежде всего мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) из различных источников, интересны как для фундаментальных исследований, так и для клинического применения в регенеративной медицине для восстановления структуры и функции поврежденных тканей и органов. МСК, обладающие способностью дифференцироваться в такие производные мезодермы как жировая, костная и хрящевая ткани, а также в миогенном направлении, выделяют из тканей взрослого организма (костный мозг, подкожный жир) и из экстраэмбриональных тканей (плацента, пупочный канатик) [1]. Большой интерес представляет поиск новых доступных источников аутологичных МСК с хорошим миогенным потенциалом для заместительной терапии нарушений опорно-двигательного аппарата и миодистрофий. Одним из таких перспективных источников является ротовая полость – заживление большинства ран ротовой полости происходит без образования рубцов, а биоптаты слизистой оболочки легко получить практически неинвазивно под местной анестезией. Стромальные клетки из различных областей ротовой полости – из пульпы зуба, собственной пластинки слизистой ротовой полости и десны обладают широким дифференцировочным потенциалом и высокой пролиферативной активностью [2]. Это может быть связано с уникальным онтогенетическим происхождением производных ротовой полости из нескольких закладок – из эктодермы, головной мезенхимы и обладающих обширными дифференцировочным и регенеративным потенциалами клеток нервного гребня [3].

Известно, что при культивировании в трехмерных условиях дифференцировочный потенциал МСК проявляется быстрее и эффективнее [4]. Клетки при помещении в неадгезивные 3D самоорганизуются с формированием трехмерных многоклеточных структур – сфероидов, которые по своему строению за счет сети межклеточных контактов и вновь синтезированного внеклеточного матрикса ближе к нативным тканям, чем монослойные культуры [5]. В сфероиде, в отличие от монослойных культур, лучше и дольше поддерживаются тканеспецифичные свойства клеток и активнее экспрессируются функциональные гены [6, 7]. В сфероиде из МСК повышена секреция противовоспалительных и проангиогенных факторов, что усиливает регенеративный потенциал клеток в 3D культуре [8].

Цель исследования – выделить МСК из свободной десны человека и сравнить миогенный потенциал полученных клеток в 2D и 3D условиях культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

После подписания здоровыми донорами добровольного информированного согласия в хирургическом стоматологическом кабинете с соблюдением правил асептики под местным обезболиванием раствором Ультракаин (1.7 мл, 40 мг/мл) выполняли биопсию слизистой оболочки десны в ретромолярной области. Биоптаты промывали стерильным раствором Хенкса с антибиотиками и антимикотиком (пенициллин 5000 МЕ/мл, стрептомицин 5000 мкг/мл, гентамицин 50 мкг/мл, флуконазол 0.2 %), измельчали механически на кусочки объемом 1–2 мм³, переносили в пробирку объемом 15 мл и заливали 2–4 мл рабочего раствора коллагеназы II типа 200 Ед./мл (Sigma, США). Инкубировали 2 часа на шейкере (37° С, 5 % CO₂). Фермент инактивировали добавлением равного объема ростовой среды и центрифугировали (7 мин, 100g). Осадок ресуспендировали в ростовой среде и помещали на адгезивные чашки Петри. Ростовая среда состояла из смеси DMEM/F12 (1:1) с L-глутамином (0,3 мг/мл) с добавлением 60 мкг/мл гентамицина и 20 % FBS (HyClone, США).

Культивирование проводили в стандартных условиях – 37 °C, 5 % CO₂, 100 % H₂ O. Смену среды и визуальный контроль состояния культур проводили раз в 2–3 дня, при достижении 70–80 % конfluентности культуры пассировали с двухкратным увеличением посевной площади. Иммунофенотипирование клеток 2D культуры 4-ого пассажа проводили по следующему профилю поверхностных маркеров: CD29, CD90, CD105, CD44, CD73, HLA-DR, CD45, CD34, CD14, CD19. Пробы инкубировали в темноте (15 мин, 25 °C) с антителами (10 мкл антител на 1 млн клеток), конъюгированными с флуоресцентным красителем фикоэритрин – PE (Miltenyi Biotec, Германия). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Sony SH800 (Sony Biotechnology, США). При достижении культурами клеток плотности выше 20 000 клеток на см² происходила спонтанная дифференцировка в миогенном направлении с образованием миотуб. Сфероиды получали из клеток 4-ого пассажа по отработанной технологии [5] на неадгезивных агарозных планшетах (Microtissue, США). Профили секреции клеток в 2D и 3D культурах анализировали по кондиционированным ими в течение 4 сут средам в двух повторах с применением набора HCYTMAG-60K-PX41 в соответствии с рекомендациями производителя на приборе Magpix (Merck, Германия). Для иммуноцитохимического анализа 2D культуры на покровных стеклах и сфероиды фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида (20 мин, 4°C), отмывали от фиксатора в растворе фосфатного-солевого буфера и инкубировали ночь при 4°C с первичными антителами к белкам MyoD, α-гладкомышечному актину и сакомерному α-актину (Abcam), отмывали пробы в растворе фосфатного-солевого буфера и инкубировали час в темноте со вторичными антителами козла к мыши, конъюгированными с DyLight 488, и антителами козла к кролику, конъюгированными с DyLight 594. Ядра докрашивали красителем бис-бензимида (Hoechst 33258, Serva). Препараты анализировали под лазерным сканирующим конфокальным микроскопом Olympus Fluoview FV10I (Olympus, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культуры МСК десны формировали колонии через 5–7 сут после ферментативной обработки биоптатов. На 4 пассаже более 96 % клеток экспрессировали характерные поверхностные маркеры – CD29, CD90, CD105, CD44, CD73 и не экспрессировали HLA-DR, маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного ряда – CD14, CD19, CD34, CD45. При достижении высокой плотности в 40 % выделенных культур МСК десны наблюдали спонтанную миогенную дифференцировку клеток с экспрессией характерного для миогенных прогениторных клеток транскрипционного фактора MyoD. Синтез характерного для дифференцированных клеток поперечно-полосатой мышечной ткани саркомерного α-актина практически отсутствовал, отсутствовал синтез одного из ключевых факторов миграционной активности и маркера миофибробластов – α-гладкомышечного актина. Таким образом, в монослойной 2D культуре МСК десны спонтанно появлялись прогениторные мышечные клетки, образовывались миотубы, но миофибриллы не формировались.

За 7 дней культивирования в 3D условиях МСК десны формировали сфероиды, в которых проходила спонтанная миогенная дифференцировка клеток. Причем в клетках сфероидов не синтезировался MyoD, маркер начальных стадий миогенеза, регулирующий формирование миотуб из прогениторных клеток. В отличие от монослойных 2D культур, в сфероидах образовывались не миотубы, а более дифференцированные миофибриллы с характерным расположением ядер по периферии и поперечной исчерченностью, выявленной окрашиванием антителами к белку саркомерного α-актина (рис. 1).

Сравнение профиля секретомы в 2D и 3D культурах МСК десны выявило повышенный уровень (в 2–10 раз) проангиогенного фактора VEGF в кондиционированных сфероидами средах. Кроме того, в средах, кондиционированных сфероидами была повышена секреция провоспалительных цитокинов (IL1, IL6, IFNγ) без изменений уровня секреции противовоспалительных цитокинов (IL8, IL10 и др.).

Культивирование соматических клеток в виде сфероидов обладает рядом преимуществ по сравнению с монослойными 2D культурами, особенно в случае низкодифференцированных клеток, так как в физиологических условиях трехмерной культуры клетки постепенно сами синтезируют необходимые для поддержания своего микроокружения компоненты внеклеточного матрикса и цитокины. В условиях 3D культуры активируется транскрипция таких факторов как Oct4, Nanog и Sox2 [9]. Известно, что экспрессия транскрипционного фактора Nanog способствует восстановлению пролиферации и миогенного потенциала МСК [10]. Вероятно, в нашей работе сходные механизмы стимулировали более эффективную миогенную дифференцировку МСК десны в сфероидах.

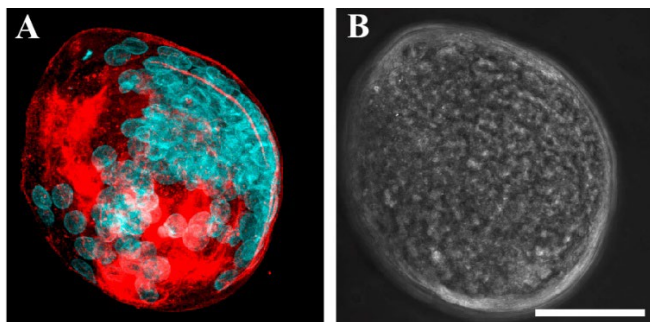


Рисунок 1. Миофибриллы в сфероиде из МСК десны. Характерное распределение саркомерного α -актинина (А, красный), ядра докрашены красителем бис-бензимидаз (А, синий), Б – видимый свет. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм

Условия 3D культивирования способствуют поддержанию как низкодифференцированных предшественников, так и сформированных миофибрилл. Сфероиды из МСК десны со спонтанной миогенной дифференцировкой представляют собой универсальные репаративные модули как для восстановления повреждений мышечной ткани *in vivo*, так и для изучения механизмов миогенеза *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлен высокий миогенный потенциал МСК из десны человека. Культивирование в 3D условиях с формированием сфероидов эффективнее стимулирует спонтанную миогенную дифференцировку с образованием характерных для организованной мышечной ткани миофибрилл и активирует секрецию VEGF, что может повысить выживаемость сфероидов в зонах повреждения. Сфероиды из МСК десны могут стать доступным источником миогенных клеточных продуктов для терапии нарушений опорно-двигательного аппарата и миодистрофий.

Исследование было поддержано НИР № 0520–2019–0026 (работа с культурами клеток и иммунофенотипирование), Российским фондом фундаментальных исследований грант № 20–04–60063 (анализ секрета), Российским научным фондом грант № 18–15–00407 (иммуноцитохимический анализ).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Y. Han, X. Li, Y. Zhang, Y. Han, F. Chang, J. Ding, Mesenchymal stem cells for regenerative medicine, *Cells* 8(8) (2019) 886.
- [2] Q. Zhang, A. Nguyen, W. Yu, A. Le, Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells, *Journal of dental research* 91(11) (2012) 1011–1018.
- [3] J. Isaac, A. Nassif, A. Asselin, I. Taihi, H. Fohrer-Ting, C. Klein, B. Gogly, A. Berdal, B. Robert, B.P. Fournier, Involvement of neural crest and paraxial mesoderm in oral mucosal development and healing, *Biomaterials* 172 (2018) 41–53.
- [4] N. – E. Ryu, S. – H. Lee, H. Park, Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells, *Cells* 8(12) (2019) 1620.
- [5] V. Repin, I. Saburina, N. Kosheleva, A. Gorkun, I. Zurina, A. Kubatiev, 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation *in vitro*, *Bull. Exp. Biol. Med.* 158(1) (2014) 137–144.
- [6] A. Gorkun, A. Shpichka, I. Zurina, A. Koroleva, N. Kosheleva, D. Nikishin, D. Butnaru, P. Timashev, V. Repin, I. Saburina, Angiogenic potential of spheroids from umbilical cord and adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells within fibrin gel, *Biomedical Materials* 13(4) (2018) 044108.
- [7] I. Zurina, A. Shpichka, I. Saburina, N.V. Kosheleva, A. Gorkun, E.A. Grebenik, D. Kuznetsova, D. Zhang, Y. Rochev, D. Butnaru, 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings *in vitro*, *Biomedical Materials* (2018).
- [8] Z. Cesarz, K. Tamama, Spheroid culture of mesenchymal stem cells, *Stem cells international* 2016 (2016).
- [9] Н.В. Кошелева, И.М. Сабурина, И.М. Зурина, А.А. Горкун, С.А. Борзенко, Д.А. Никишин, Т.Д. Колокольцова, Е.Е. Устинова, В.С. Репин, Технология создания мультипотентных сфероидов из мезенхимных стромальных клеток лимба для репарации поврежденных тканей глаза, *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 60(4) (2016) 160–167.
- [10] J. Han, P. Mistriotis, P. Lei, D. Wang, S. Liu, S.T. Andreadis, Nanog reverses the effects of organismal aging on mesenchymal stem cell proliferation and myogenic differentiation potential, *Stem Cells* 30(12) (2012) 2746–2759.
- [11] F. Relaix, P.S. Zammit, Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage, *Development* 139(16) (2012) 2845–2856.
- [12] O. Sheveleva, O. Payushina, V. Starostin, Cellular and molecular basis of skeletal muscle histogenesis, *Biology Bulletin* 39(6) (2012) 495–503.