

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ  
КЛЕТОК ДОНОРОВ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП  
THE COMPARISON OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL  
STROMAL CELLS IN DONORS OF DIFFERENT AGE GROUPS**

**Ю. В. Сердюков<sup>1</sup>, А. Ю. Адамович<sup>2</sup>, В. К. Шадрина<sup>2</sup>, Д. Б. Нижегородова<sup>1,2</sup>  
Yu. V. Serdukov<sup>1</sup>, A. Yu. Adamovich<sup>2</sup>, V. K. Shadrina<sup>2</sup>, D. B. Nizheharodava<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования  
г. Минск, Республика Беларусь  
georg-med@tut.by

<sup>1</sup>Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Republic of Belarus

В настоящей работе исследованы морфо-функциональные характеристики (жизнеспособность, экспрессия иммунофенотипических маркеров, пролиферативный и дифференцировочный потенциал, иммуносупрессивные свойства) мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных от доноров разных возрастных групп.

The morpho-functional characteristics (viability, sterility, immunophenotype, proliferative and differentiation potential, immunosuppressive properties) of multipotent mesenchymal stromal cells obtained from donors of different age groups are presented in this work.

*Ключевые слова:* мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, доноры, фенотип, пролиферация, дифференцировка, иммуносупрессия.

*Keywords:* multipotent mesenchymal stromal cells, donor, phenotype, proliferation, differentiation, immunosuppression.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-111-114>

Клеточная трансплантология, также известная как клеточная терапия представляет собой комплекс терапевтических подходов, основанных на инфузии биомедицинского клеточного продукта в организм пациента. Одним из широко известных и стремительно развивающихся направлений клеточной трансплантологии является терапия стволовыми клетками – недифференцированными клетками, имеющимися у многих видов многоклеточных организмов [1]. На сегодняшний день стволовые клетки в зависимости от происхождения делят на три категории: эмбриональные, фетальные и взрослые стволовые клетки. Эмбриональные стволовые клетки представляют собой стволовые клетки, выделяемые из ранних эмбрионов (на этапе бластоцисты или из полового зачатка 5-недельных эмбрионов) или тератокарциномы (опухолевой линии) *in vitro*. Фетальные стволовые клетки – клетки, находящиеся в пуповинной крови, плаценте, способные трансформироваться в разные типы клеток (мультипотентные клетки) [2]. Среди стволовых клеток взрослого организма выделяют: гемопоэтические стволовые клетки (присутствуют в кроветворных органах и крови, способны давать начало различным росткам кроветворения); мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки (МСК) (находятся в костном мозге, жировой ткани и других тканях и обладают способностью к дифференцировке в различных направлениях); тканеспецифические стволовые клетки (локализуются регионарно в соответствующих тканях и дифференцируются в клетки данных тканей) [3].

В настоящий момент доказано, что поддержание и возобновление клеточного состава практически всех тканей организма человека, включая эпителий кожи и кишечника, печень, скелетные мышцы и миокард, происходят благодаря пролиферации и дифференцировке соответствующих тканеспецифических клеток и МСК. В связи с этим, перспективным направлением клеточной терапии является использование культур МСК и биомедицинских клеточных продуктов, полученных на их основе. МСК представляют немногочисленную популяцию фибробластоподобных клеток стромы, для которых характерны такие общие свойства как способность к симметричному и асимметричному делению, высокий пролиферативный потенциал, способность к адгезии, фибробластоподобная морфология, образование колоний в культуре, легко индуцируемая дифференцировка [4].

Однако, согласно литературным данным функциональный потенциал МСК может определяться возрастом организма, из которого МСК получены. При этом рядом авторов показаны противоположные результаты [4, 5]. В одних исследованиях поддерживается гипотеза отрицательной корреляции между возрастом и пролиферативной способностью и установлено возрастное снижение пролиферативной способности, сопровождаемое сокращением дифференцировочного потенциала и полное снижение остеогенного потенциала. Другими авторами

установлена положительная корреляция между остеогенезом и маркерами, такими как коллаген 1-го типа, специфическая щелочная фосфатаза, активность и концентрация кальция, и возраст донора при остеодифференцировке. Показано, что МСК от пожилых доноров способны выдержать остеодифференцирование, и при этом не наблюдалось уменьшение в остеогенном потенциале МСК. Также не выявлены возрастные изменения в числе колониобразующих единиц МСК и не обнаружены эффекты репликативного старения, а, наоборот, показано, что число и пролиферативная способность МСК оставались в норме с течением времени.

В связи с этим целью данной работы явилось оценка морфо-функциональных характеристик мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных от доноров разных возрастных групп.

### Материалы и методы исследования

Материалом исследования явились образцы костного мозга объемом 40 мл, полученные от доноров молодого (группа 1), среднего (группа 2) и пожилого (группа 3) возраста (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика материала исследования

Группы доноров	n	Возраст, лет	Количество выделенных мононуклеарных клеток	Полученные пассажи культур МСК
Группа 1	5	19–30	$10,14 \times 10^7$ ( $5,03 \times 10^7 \div 10,60 \times 10^7$ )	P <sub>0</sub> –P <sub>2</sub>
Группа 2	6	48–53	$11,33 \times 10^7$ ( $8,32 \times 10^7 \div 9,79 \times 10^7$ )	P <sub>0</sub> –P <sub>2</sub>
Группа 3	2	63–65	$12,00 \times 10^7$ ( $10,44 \times 10^7 \div 13,34 \times 10^7$ )	P <sub>0</sub> –P <sub>2</sub>

Для выделения МСК суспензию пунктата костного мозга разводили в физиологическом растворе (ФР) в соотношении 2:1 и центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об/мин на градиенте плотности ROTI®Sep 1077 (CarlRoth, Германия). Полученное кольцо мононуклеаров костного мозга двукратно отмывали центрифугированием в ФР с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Lonza, Германия) при 1500 об/мин в течение 10 мин. Полученную суспензию клеток, содержащую МСК, в дальнейшем культивировали в чашках Петри (d=100 мм) в концентрации  $3,7 \times 10^7$  клеток на чашку в полной культуральной среде на основе DMEM (Invitrogen, Великобритания) с 10% содержанием ЭТС, 1% L-глутамин (Sigma, Германия) и 1% антибиотика-антимикотика (Sigma, Германия) при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Через сутки после посева, при полной смене питательной среды, удаляли неадгезированные клетки. В течение всего срока культивирования смену среды проводили каждые 3–4 суток. При достижении первичной культуры МСК субконфлюэнтности клетки пересевали для получения 1-го и последующих пассажей с использованием 0,025% раствор трипсина с ЭДТА (Sigma, Германия). Фермент инактивировали добавлением 5% ЭТС в ФР. Суспензию клеток после двукратного отмывания в ФР с 5% ЭТС высевали в концентрации  $3 \times 10^5$  клеток в чашку Петри в полной питательной среде. Для микроскопии и мониторинга культур использовали инвертированный микроскоп Axiovert 200 (CarlZeiss, Германия). Все этапы получения и культивирования МСК проводили в стерильных условиях. Микробиологический контроль стерильности культур МСК проводили путем посева по 1000 мкл культурального супернатанта в пробирки со средой Сабуро, тиогликолевой средой и питательным бульоном.

Жизнеспособность МСК рассчитывали по окрашиванию суспензии 0,4%-ным раствором трипанового синего в ФР в камере Горяева на 100 клеток. Пролиферативная активность МСК оценивалась путем подсчета числа (ЧУП) и времени (ВУП) удвоения клеточных популяций по формулам (1) и (2):

$$\text{ЧУП} = \log_{10} (n/N) \times 3.33 \quad (1)$$

где n – начальное количество клеток, N – конечное количество клеток

$$\text{ВУП} = \text{время роста культуры (дни)} / \text{ЧУП} \quad (2)$$

Для характеристики мультипотентности МСК оценивали их способность дифференцироваться в остео-, адипо- и нейрогенном направлениях в специализированных средах: в адипогенном и остеогенном направлениях использовали полную культуральную среду DMEM, содержащую индукторы адипогенеза (50 мкг/мл аскорбиновой кислоты,  $10^{-7}$  М дексаметазона, 50 мкг/мл индометацина) или остеогенеза ( $10^{-8}$  М дексаметазона, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10мМ глицерол-2-фосфата). Для нейрогенной дифференцировки использовали среду NeuroCult с нейрогенной добавкой (Stem Cells Technology, Канада). В контрольных культурах клеток клетки культивировали в стандартной среде. По истечении 4 недель культивирования в полученных средах культуры клеток окрашивали красителями OilRed O и AlizarinRed (Sigma, Германия) для подтверждения адипогенной и остеогенной дифференцировки, соответственно.

Определение фенотипа МСК осуществляли методом проточной цитометрии с использованием 5-канального проточного цитометра Cytotflex (BeckmanCoulter, США) и панели моноклональных антител CD90-FITC, CD44-FITC, CD105-PE, CD31-FITC, CD14-ECD, CD34-APC, CD45-PC7, CD271-PE (Beckman Coulter, США, R&D, Канада). Клетки инкубировали с соответствующими антителами или негативными контролями в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Регистрацию результатов осуществляли на 10 000 событий.

Для оценки способности МСК супрессировать митоген-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов мононуклеары периферической крови (МПК) доноров, окрашенные карбоксифлуоресцеином (CFSE, Fluka, Германия) культивировали в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/лунку 96-луночного круглодонного планшета в полной культуральной среде, содержащей 2,5 мкг/мл фитогемагглютинаина (ФГА, Sigma, Германия) в присутствии МСК ранних пассажей или в их отсутствие в течение 6 дней при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Регистрацию количества пролиферирующих и непролиферирующих Т-клеточных субпопуляций осуществляли на 6-й день культивирования методом проточной цитофлуорометрии с использованием моноклональных антител CD3-PC7 (Beckman Coulter, США). Пролиферацию Т-лимфоцитов и их субпопуляций оценивали как процент непролиферирующих (CFSE<sup>high</sup>) и пролиферирующих (CFSE<sup>low</sup>) Т-клеток. Результаты регистрировались на 20000 событий в случае. На основании полученных данных рассчитывали коэффициент супрессии МСК митоген-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов  $k$  (%), отражающий степень выраженности ингибирующего влияния МСК на клеточное деление, согласно формуле (3).

$$k = 100 - \frac{\Pi_{Т+МСК}}{\Pi_{Т}} \times 100 \quad \% \quad (3)$$

где  $\Pi_{Т+МСК}$  – количество поделившихся Т-лимфоцитов в ко-культуре МПК и МСК, стимулированной митогеном, %;  $\Pi_{Т}$  – количество поделившихся Т-лимфоцитов в культуре МПК, стимулированной митогеном, %. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 8.0.

### Результаты и обсуждение

Морфология культур МСК исследуемых групп доноров статистически значимо не отличалась. Во всех культурах к 20-30 суткам культивирования формировалось большое количество варьирующих по размеру колоний веретеновидных фибробластоподобных клеток с многочисленными межклеточными контактами, и появлялся равномерный конглоэнтный монослой вихреобразно растущих клеток (рисунок 1).

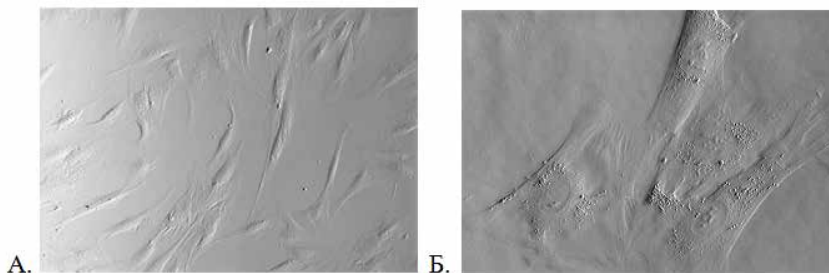


Рис.1 – Морфология культур МСК 1-го пассажа на 10-е сутки: А – ув.100×; Б – ув.400×

Жизнеспособность и пролиферативный потенциал культур МСК представлены в таблице 2. При сохранении высоких показателей жизнеспособности в группе 3 доноров пожилого возраста наблюдалось снижение показателей ЧУП и увеличение ВУП относительно группы 1 и 2 ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о замедлении скорости пролиферации клеточных культур.

Таблица 2 – Жизнеспособность, число и время удвоения культур МСК

Группы доноров	Жизнеспособность, %	Концентрация МСК с 1 чашки Петри (d=100мм)	Число удвоение популяции	Время удвоение популяции, дни
Группа 1	88 (85,5÷91)	$62,0 \times 10^7$ (48÷67,1)	2,63 (1,08÷3,7)	24 (20÷28)
Группа 2	90 (86,75÷92,75)	$52,4 \times 10^7$ (18,85÷80,75)	2,21 (1,67÷3,29)	26 (20÷31)
Группа 3	89 (86,25÷91,55)	$35,5 \times 10^7$ (30,75÷40,25)	1,54 (0,01÷3,58)	35 (32÷37)

В ходе исследования не установлено принципиальных различий в способности клеточных культур МСК доноров различного возраста дифференцироваться в адипоциты. Во всех исследуемых группах в ответ на адипогенную стимуляцию до 90% клеток в течение 2 недель формировали липидные включения, отчетливо заметные после окрашивания жирорастворимым красителем. При культивировании МСК в среде с остеогенными факторами на 21 сутки наблюдалось образование кальций-содержащего матрикса, что подтверждалась окраской ализариновым красным, в то время как в контрольных культурах окрашивание отсутствовало. По аналогии с адипогенной дифференцировкой не установлено принципиальных различий в способности клеточных культур МСК дифференцироваться в остеогенном направлении. Морфологическая характеристика культур МСК, культивируемых по протоколу нейрогенной дифференцировки, выявила выраженные изменения во всех группах доноров, а именно, округление клеток и утрату фибробластоподобной морфологии с группированием во флотирующие сферические агрегаты клеток – нейросферы к 7-м суткам. По мере культивирования нейросферы увеличивались в размере за

счет пролиферации клеток в них и представляли собой шаровидные структуры, содержащие 100 и более клеток, предположительно, находящиеся на различных этапах нейральной дифференцировки.

При анализе экспрессии поверхностных белков установлено, что культуры МСК исследуемых групп экспрессировали на высоком уровне CD90, CD105, CD44 и CD271. При этом содержание в исследуемой культуре клеток, экспрессирующих стандартные антигены CD90, CD105, CD44, составило более 90%, и экспрессирующих специфических рецептор к фактору роста нервов (CD271) – более 60%. Вместе с тем отсутствовала экспрессия маркера гемопоэтических стволовых клеток CD34, маркера гемопоэтических клеток CD45, маркера моноцит/макрофагальной фракции клеток CD14, маркеров эндотелиальных клеток CD31. Таким образом, иммунофенотип исследуемых клеточных культур определялся как CD90+CD105+CD44+CD271+CD34-CD45-CD14-CD31 и сохранял свою стабильность в течение длительного культивирования во всех группах.

Для характеристики *in vitro* иммуномодулирующего эффекта МСК на митоген-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов проведена оценка количества пролиферирующих CD3<sup>+</sup>Т-клеток в ко-культурах МПК и МСК и в культурах МПК, стимулированных митогеном ФГА. Показано, что под действием неспецифического активатора пролиферации ФГА наблюдается снижение интенсивности флюоресценции и смещение пика влево с увеличением количества CFSE<sup>low</sup>Т-лимфоцитов, что свидетельствует о высокой пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Количество поделившихся клеток составило 70,1%. Добавление МСК в культуру клеток МПК резко снижало *in vitro* пролиферацию Т-лимфоцитов, что выражалось в уменьшении количества поделившихся CFSE<sup>low</sup> клеток при культивировании.

Установлено, что иммуносупрессивная способность МСК в отношении митоген-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов статистически значимо не отличалась в исследуемых возрастных группах: коэффициенты супрессии составили 58,7 % (47,1 % ÷ 66,8 %), 57,9 % (54,7 % ÷ 66,2 %) и 52,4 % (47,7 % ÷ 63,5 %), соответственно, у клеточных культур МСК, полученных от молодых доноров и доноров среднего и пожилого возраста.

### Заключение

В результате выполненных исследований разработаны критерии контроля качества МСК, включающие оценку жизнеспособности клеточных культур, пролиферативный потенциал, экспрессию иммунофенотипических маркеров, определение дифференцировочной способности, характеристику иммуносупрессивного потенциала у доноров различных возрастных групп. Сравнительная характеристика морфо-функциональных критериев культур МСК в зависимости от возраста источника материала показала отсутствие статистически значимых различий в морфологии, фенотипе, дифференцировочном и иммуносупрессивном потенциале культур, в то время как пролиферативная способность статистически значимо снижалась в культурах МСК, полученных от доноров пожилого возраста, что необходимо учитывать при подготовке биомедицинского клеточного продукта мультипотентных МСК для клеточной терапии.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Зафранская, М. М. Методологический подход к оценке иммуномодулирующего действия клеточной терапии у пациентов с рассеянным склерозом после аутологичной трансплантации мезенхимальных/стромальных стволовых клеток / М.М. Зафранская, А.С. Федулов, Д.Б. Нижегородова и др. // Инновационные технологии в медицине. 2013;1(1):39–51.
2. Калинина, Н. И. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей / Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева, К.А. Рубина и др. // Acta naturae. 2011;3:4(11):32–39.
3. Lopatina T. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo / T. Lopatina, N. Kalinina, M. Karagyaur, D. Stambolsky [et al.] // PLoS One. 2011;6:e178–199.
4. Wagner W. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells / Wagner W, Bork S, Horn P, Krunic D, Walenda T, Diehlmann A [et al.] // PLoS One. 2009;4(6):e5846.
5. Veronesia F. Mesenchymal stem cells in the aging and osteoporotic population / Veronesia F, Torricellia P, Borsarib V, Tschon M, Rimondinic L, Fini M // Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression. 2011;21(4):363–377.