

На правах рукописи



БЛАТТ Наталия Львовна

**ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЗАЧАТКОВ
ПУЛЬПЫ ТРЕТЬЕГО МОЛЯРА ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саранск – 2012

Работа выполнена на базе ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» и ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Альберт Анатольевич Ризванов

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Виктор Владимирович Валиуллин

доктор медицинских наук, профессор
Андрей Германович Гунин

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН

Защита состоится 16 марта 2012 г. в _____ часов на заседании диссертационного Совета Д 212.117.01 при ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева» (430005, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева» (430005, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68). Автореферат диссертации опубликован на официальном сайте ФГБОУ www.mrsu.ru; e-mail: dsovet@mrsu.ru

Автореферат разослан «___» февраля 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
доктор биологических наук, профессор  В.П. Балашов

Актуальность исследований

Проблема лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний остается одной из самых значимых и актуальных в медицинской практике. Эта актуальность обусловлена, с одной стороны, высокой встречаемостью этих видов патологии, а с другой – практически полным отсутствием эффективных методов лечения. Такое положение связано, в первую очередь, с явно недостаточной изученностью клеточных основ появления этих заболеваний, в том числе и их регенераторного потенциала.

Биомедицинские клеточные технологии с применением стволовых клеток – новая, но уже активно используемая многообещающая область биологии и практической медицины, которая развивается во всем мире (Trounson et al., 2011). Вместе с тем вопросов в этой области намного больше, чем ответов, что не позволяет использовать трансплантацию разнообразных типов клеток для эффективного лечения онкологических и дегенеративных заболеваний. Наиболее распространенной клеточной технологией является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, которая, однако, используется в основном для лечения заболеваний системы крови (Perez et al., 2011; Румянцев и др., 2011). Однако многие аспекты функционирования стволовых клеток исследованы явно недостаточно, что приводит к возникновению побочных эффектов. Вот почему одной из наиболее актуальных проблем регенеративной медицины является поиск новых источников стволовых клеток для разработки перспективных биомедицинских клеточных технологий и последующего их клинического применения для восстановления функций различных органов и систем.

В этой связи особый интерес представляют собой стволовые клетки взрослого организма, получение которых не связано с разрушением эмбриона человека (Ebben et al., 2011; Шутова и др., 2009), как в случае с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК). Вместе с тем многие аспекты поведения этих клеток при введении в различные ткани исследованы недостаточно. Наиболее распространенный тип мультипотентных стволовых клеток (МСК), способных к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении (Pevsner-Fischer et al., 2011; Домарацкая, 2011) и который в настоящее время широко используется для разработки новых клеточных биомедицинских технологий, – это так называемые мезенхимные стволовые клетки, но и они исследованы в недостаточной степени. В последнее время показано, что МСК играют важную роль в самообновлении и регенерации множества других органов и тканей, вот почему их

применение в клинической практике является перспективным. Помимо костного мозга, МСК выделяют из жировой ткани, хрящей, пуповины и пуповинной крови, плаценты, пульпы зубов и других тканей человека (Tarnok et al., 2010; Терских и др., 2010). В последнее время активно исследуют возможность трансплантации МСК для лечения различных заболеваний человека, таких как ишемические заболевания, стимуляции посттравматической регенерации различных мезодермальных тканей и заболеваний иммунной системы (Kuraitis et al., 2011; Tyndall et al., 2009, Иванюк и др., 2011). Однако преждевременно говорить о высокой эффективности и безопасности применяемых технологий.

Одним из перспективных источников стволовых клеток являются зачатки и пульпа третьих моляров (зубов мудрости) человека (Tziafas et al., 2010; Yalvac et al., 2010). Главным преимуществом этого источника является доступность биологического материала. По своим морфологическим и фенотипическим свойствам эти клеточные популяции аналогичны мезенхимным стволовым клеткам человека, поскольку они обладают свойством клоногенности, способны пролиферировать как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, характеризуются мультипотентностью направлений дифференцировки (Pevsner-Fischer et al., 2011; Tarnok et al., 2010). Как и любой другой новый источник стволовых клеток, стволовые клетки из зачатков третьих моляров человека требуют тщательного исследования как с точки зрения генетических и фенотипических особенностей, так и с точки зрения безопасности и эффективности для клеточной терапии.

Еще одним малоисследованным аспектом этой проблемы является взаимодействие стволовых и опухолевых клеток, что может быть возможной причиной возникновения и развития опухоли (Bohl et al., 2011; Muehlberg et al., 2009, Лебедев, 2010). Так, показано, что мезенхимные стволовые клетки способны создавать ниши с микроокружением, в которые могут мигрировать опухолевые клетки, например при метастазировании (Rhodes et al., 2010). Вместе с тем механизмы взаимодействия этих клеток пока неизвестны, также как и не до конца понятен конечный результат такого взаимодействия. Кроме того, стоит учитывать высокий пролиферативный потенциал стволовых клеток, который может быть в том числе связан с возможностью их трансформации и стимуляции опухолевого роста (Дорошенко и др., 2007). Эти исследования важны как для понимания фундаментальных аспектов развития и персистенции онкологических заболеваний, так и, например, для разработки новых методов тестирования противоопухолевых препаратов.

Таким образом, исследование различных аспектов функционирования разнообразных стволовых клеток носит фундаментальный характер, несомненно актуально и может оказаться полезным для разработки инновационных клеточных технологий лечения дегенеративных заболеваний.

Цель работы: провести выделение и исследование стволовых клеток из зачатков пульпы третьих моляров человека и изучить их взаимодействие с различными химическими (блок сополимеры), физическими (криоконсервация) и биологическими (клетки нейробластомы человека) факторами *in vitro*.

В соответствии с целью работы определены следующие **экспериментальные задачи:**

1. Выделение и культивирование стволовых клеток из зачатков пульпы третьих моляров человека;
2. Иммунофенотипический и молекулярно-генетический анализ стволовых клеток из зачатков пульпы третьих моляров человека;
3. Исследовать влияния физических (криоконсервация) и химических (неионные блок-сополимеры) факторов на морфологию, пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток из зачатков пульпы третьих моляров человека;
4. Изучить взаимодействия клеток нейробластомы и стволовых клеток из зачатков пульпы третьих моляров человека *in vitro* при совместном культивировании на различных биологических субстратах.

Научная новизна. В результате проведенного комплексного исследования по выделению, фенотипическому и генетическому анализу стволовых клеток, полученных из зачатков третьих моляров человека, показано, что полученные клетки обладают фенотипом, аналогичным мезенхимных стволовых клеток, экспрессируют высокий уровень мРНК генов факторов транскрипции, характерных для плюрипотентных стволовых клеток, и способны к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном, остеогенном и нейрональном направлении. Впервые показано, что неионные блок-сополимеры обладают выраженным биологическим эффектом на стволовые клетки из зачатков третьих моляров человека, повышая их пролиферацию и способность к дифференцировке в остеогенном

направлении. Новыми следует признать данные, полученные на основе совместного ко-культивирования стволовых клеток из зачатков третьих моляров человека и клеток нейробластомы человека с применением методов анализа культур клеток в реальном времени, по взаимодействию стволовых и опухолевых клеток человека. Эксперименты по криоконсервации стволовых клеток из зачатков третьих моляров человека показали, что заморозка и хранение клеток не оказали существенного влияния на способность к пролиферации, дифференцировке и нейропротекции на модели *in vitro*. Показано, что мультипотентные стволовые клетки из зачатков третьих моляров человека и клетки нейробластомы человека при совместном ко-культивировании способны к выраженной самоорганизации в присутствии различных компонентов внеклеточного матрикса или его заменителя. Присутствие стволовых клеток повышало выживаемость клеток нейробластомы в условиях окислительного стресса.

Положения, выносимые на защиту:

1. Неионный блок-сополимер Плуроник Р85 повышает жизнеспособность и остеогенную дифференцировку стволовых клеток из зачатков третьих моляров человека;

2. Мультипотентные стволовые клетки из зачатков пульпы третьих моляров человека способны к длительной криоконсервации без существенного изменения способности к пролиферации, дифференцировке и нейропротекции *in vitro*;

3. Клетки нейробластомы и стволовые клетки из зачатка третьих моляров человека способны к самоорганизации в различные структуры и функциональному взаимодействию при совместном ко-культивировании *in vitro* на различных биологических субстратах.

Научно-практическая значимость

Проведенное подробное исследование мультипотентных стволовых клеток, выделенных из зачатков третьих моляров человека (МСК из ЗТМ), закладывает основу для разработки методов клеточной терапии. Апробированные методы криоконсервации и хранения клеток при низкой температуре могут быть использованы в различных клинических приложениях. На моделях *in vitro* показана нейропротекторная и ангиогенная эффективность МСК из ЗТМ. Впервые показано, что неионные блок-сополимеры (Плуроники) оказывают выраженный биологический эффект на

стволовые клетки человека. Это важно для разработки новых методов терапии с применением Плуриоников в качестве переносчиков лекарственных препаратов. Разработанный способ двойного мечения клеточных популяций с помощью витальных мембранных флуоресцентных красителей позволяет проводить прижизненную оценку поведения клеток при совместном ко-культивировании. Применение совместных ко-культур стволовых клеток и опухолевых клеток перспективно для разработки тест-систем для скрининга противоопухолевых препаратов.

Связь работы с базовыми научными программами

Работа поддерживалась грантами:

2010 г. – молодежный грант Академии наук Республики Татарстан, №11-20/2010(Г) «Разработка тест-системы на основе ко-культуры раковых и мезенхимальных стволовых клеток для скрининга противораковых препаратов».

2010 г. – дополнительный заказ-наряд Министерства образования и науки РФ. Номер гос. регистрации 01201054754 «Разработка комбинированных генных и клеточных подходов для терапии дегенеративных заболеваний человека».

2009–2010 гг. – государственный контракт ФЦП Федерального Агентства по науке и инновациям 02.552.11.7088 «Проведение поисковых научно-исследовательских работ в области физико-химии наноматериалов и молекулярных систем, включая биологические, в центре коллективного пользования научным оборудованием "Федеральный центр коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов"».

2009–2011 гг. – государственный контракт ФЦП Федерального агентства по науке и инновациям 02.740.11.0302 «Исследование фундаментальных механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний и разработка современных технологий для их лечения».

2009–2010 гг. – единый заказ-наряд Министерства образования и науки РФ. Код проекта 1.4.09 (номер гос. регистрации 01200952944). «Исследование механизмов репрограммирования стволовых и соматических клеток человека в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки».

2008–2010 гг. – грант РФФИ 08-04-01680-а «Изучение дедифференцировки гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови человека в плюрипотентные клетки методом генетической модификации факторами транскрипции Oct4, Sox2, cMyc и Klf4».

2007–2010 гг. – грант НАТО NR.RIG.983007 «Combination gene and stem cell therapy for treating neurodegenerative diseases».

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на следующих всероссийских и международных симпозиумах, конгрессах и конференциях: I Всероссийский конгресс студентов и аспирантов биологов «Симбиоз-Россия 2008» (Казань, 2008); II Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008); XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2009); Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова (Пушино, 2009); Всероссийская научная школа-конференция для молодежи «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» (Москва, 2009); Международная научная школа для молодежи «Инновационные технологии в здравоохранении: молекулярная медицина, клеточная терапия, трансплантология, реаниматология, нанотехнологии» Международной научной конференции «Инновационные технологии в реальном секторе экономики» (Екатеринбург, 2009); The 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders» (Kazan, 2009); V Международная (XIV Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, 2010); XV Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2010); 14 Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ. Наука XXI века» (Пушино, 2010); III Международный Симпозиум «Актуальные вопросы клеточных технологий» (Москва, 2010); XVI Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 3 отечественных и зарубежных работы в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК для защиты кандидатских и докторских диссертаций, 13 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях и конгрессах.

Место выполнения работы. Основные экспериментальные данные получены автором в Казанском государственном медицинском университете (2008–2011) и на кафедре генетики биолого-почвенного факультета Казанского (Приволжского) федерального университета (2007–2011).

Структура и объем работы. Материалы диссертационной работы изложены на 136 страницах машинописного текста. Работа содержит 28 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка литературы (207 наименований).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры клеток

Стволовые клетки были выделены из непрорезавшихся зачатков третьих моляров (МСК из ЗТМ), извлеченных хирургическим путем у здоровых пациентов (11–17 лет) как часть профилактического лечения по ортодентическим причинам. Выделение проводили по методике, применяемой ранее для выделения стволовых клеток из пульпы третьих моляров человека (Yalvac et al., 2009). Всю зародышевую ткань зуба, включая находящуюся внутри развивающуюся корону и окружающую его фолликул, вырезали, нарезали мелкими кусочками стерильным скальпелем и культивировали на модифицированной питательной среде DMEM с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы (FBS) при 37 °С во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ (2006).

В работе использовалась клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC номер: CRL-2266).

Совместное ко-культивирование происходило путем посева клеток МСК из ЗТМ и SH-SY5Y в различных концентрациях в 12-луночные планшеты. Ко-культуры поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% FBS при 37 °С во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂.

Клетки МСК из ЗТМ и SH-SY5Y метили с использованием РКН26 (красный) и РКН67 (зеленый) флуоресцентными красителями в соответствии с инструкциями производителя (Sigma, USA). Используемые флуоресцентные красители позволяют проводить окрашивание мембран живых клеток (витальные красители) без существенного влияния на их жизнеспособность и другие биологические свойства.

Криоконсервацию клеток МСК из ЗТМ проводили в среде для замораживания DMEM, содержащей 10% диметил-сульфоксида, 20% FBS

(Pegg, 2007). Клетки ресуспензировали в среде и замораживали в специальном контейнере в соответствии с инструкциями производителя (Nalgene, USA). В дальнейшем клетки хранили при -80°C .

Для подтверждения способности к дифференцировке клетки МСК из ЗТМ дифференцировали в остео-, нейро- и адипо-генные клетки на основе протоколов, описанных ранее (Yalvac et al., 2010).

Модификацию поверхности пластика для культивирования клеток проводили с помощью поли-L-лизина, Матригеля, фибронектина, желатина или коллагена (Harris et al., 2006).

Проточная цитофлуориметрия

Экспрессию поверхностных антигенов оценивали методом проточной цитометрии с помощью первичных антител (АТ) к CD14 (cat #SC-7328), CD29 (cat #BD556049), CD34 (cat #SC-51540), CD45 (cat #SC-70686), CD90 (cat#SC-53456), CD105 (cat #SC-71043), CD133 (cat #SC-65278), CD166 (cat #SC-53551) (SantaCruz Biotechnology Inc., USA) и CD73 (cat #550256) (Zymed, San Francisco, CA, USA). После того, как клетки отмыли от несвязавшихся антител, все клетки инкубировали со вторичными АТ к иммуноглобулинам кролика или мыши, конъюгированных с FITC. Анализ клеток проводили на проточном цитометре Becton Dickinson FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) согласно инструкциям производителя (Hawley et al., 2004).

Иммуноцитохимический анализ

Иммуноцитохимический анализ проводили согласно стандартной методике (Oliver et al., 2010). Выращенные на покровных стеклах клетки МСК из ЗТМ фиксировали 2% параформальдегидом с добавлением 0,1% Triton-X100 в буфере PBS. Образцы инкубировали с первичными антителами (IgG): анти-нестин (cat #AB5922) (Millipore, USA), анти-коллаген типа I (cat#SC-80565), анти-NFL (cat #SC-2562) (SantaCruz Biotechnology Inc., USA), и анти- β_3 -тубулин (cat#G712A) (Promega, USA). После промывки добавляли вторичные АТ козла к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с Alexa-488 (Invitrogen, USA). В качестве ядерного красителя использовали DAPI (Sigma, USA). Окрашенные покровные стекла наклеивали на чистые предметные стекла при помощи раствора Mowiol (Calbiochem, USA). Сразу после приготовления препараты исследовали и фотографировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP2 SE (Leica, Germany).

Окрашивание клеток методом van Kossa проводили с использованием коммерческого набора согласно рекомендациям производителя (Bio-optica, Milano, Italy), после чего кристаллы кальция наблюдали в световом микроскопе (Nikon TS100, Minnesota, MN, USA).

Анализ экспрессии мРНК генов с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Общую РНК выделяли из клеток МСК из ЗТМ при помощи набора RNeasy Mini Kit, в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen, Germany). Синтез кДНК осуществляли с помощью набора Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Qiagen). Полученный препарат кДНК применяли непосредственно для ПЦР-РВ или хранили при -20 °С.

Для количественной оценки экспрессии генов-мишеней в работе применяли ПЦР-РВ по технологии TaqMan или SYBR Green (Nolan et al., 2006). Поиск комбинаций праймеров и проб для ПЦР-РВ проводили с помощью программного пакета PrimerExpress (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве контроля количества наносимого образца применяли комбинации праймеров, специфичных к гену β-актина человека. ПЦР-РВ проводили на приборе iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection system (BioRad, США).

Анализ жизнеспособности и пролиферации клеток

Условия окислительного стресса моделировали инкубированием совместных ко-культур МСК и клеток SH-SY5Y в 300 мкМ растворе пероксида водорода (H₂O₂) в течение 20 ч. в термостате. Далее клетки трипсинизировали до получения гомогенной клеточной суспензии, промывали буфером PBS и мертвые клетки окрашивали, используя раствор пропидиум иодида (Hawley, Hawley and Totowa, 2004). Клеточную суспензию анализировали при помощи проточной цитофлуорометрии на приборе Becton Dickinson FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Неионный блок-сополимер Плуроник Р85 (BASF) добавляли в культуральную среду в конечной концентрации от 0,0001% до 1% (вес/объем). Пролиферацию клеток определяли колориметрически с помощью реагента MTS (Promega) на планшетном анализаторе CERES 900NDi (Bio-Tek Instruments, Inc.) через 24 и 72 часа после добавления Плуроника Р85.

Статистический анализ данных

Статистический анализ проводили методом t-критерия Стьюдента (Лакин, 1990) в программе Microsoft Excel 2002.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Генетический и морфологический анализ культуры мультипотентных стволовых клеток зачатка третьего моляра человека

Из удаленных зубных зачатков создали 8 клеточных линий (клетки МСК из ЗТМ). Выращенные *in vitro* клетки показали фибробласто-подобную морфологию. Все клеточные линии поддерживались на протяжении 20–35 пассажей без изменений фенотипа. Все полученные линии клеток МСК из ЗТМ были положительными по маркерам дифференцировки CD29, CD73, CD90, CD105 и CD166, характерным для мезенхимных стволовых клеток, но не по маркерам дифференцировки CD14, CD34, CD45 и CD133, характерным для гемопоэтических клеток (рис.1).

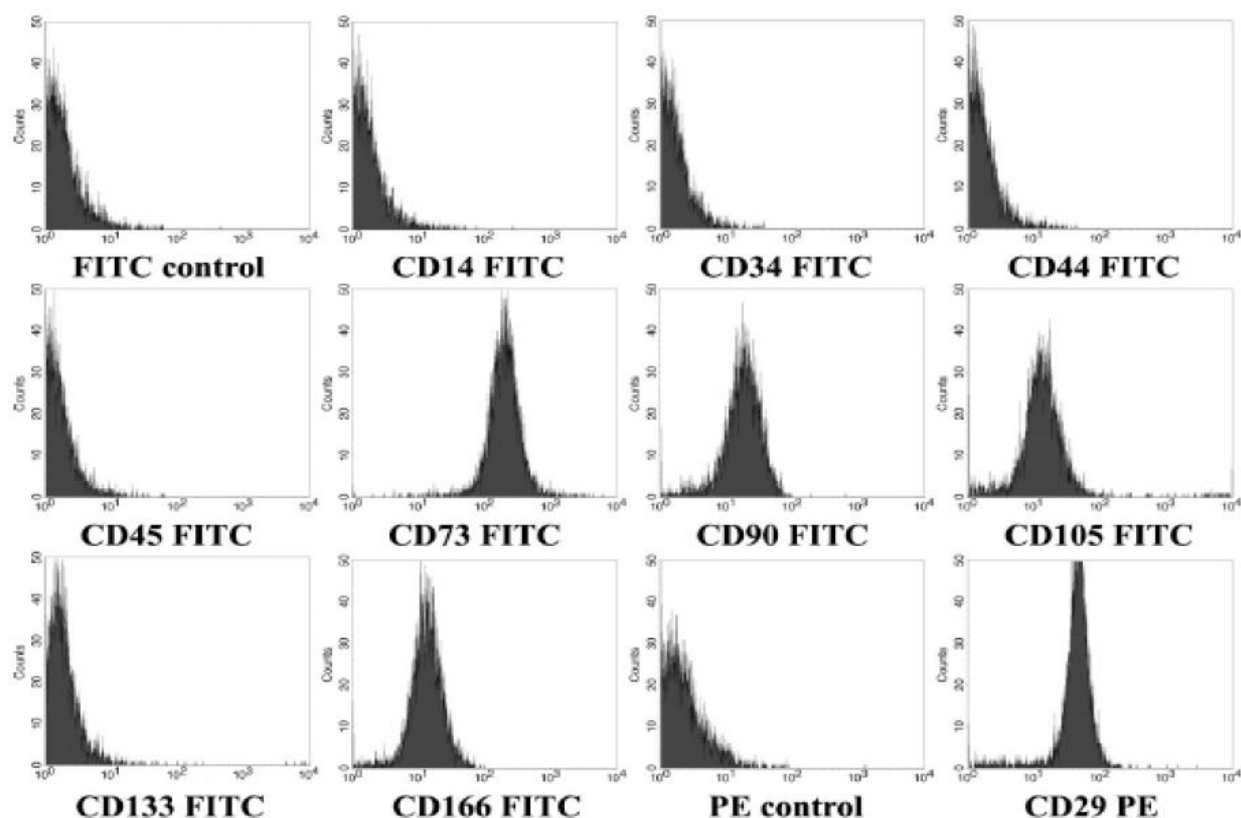


Рис. 1. Экспрессия маркеров дифференцировки стволовыми клетками из третьих моляров человека. Иммунофлуоресцентный анализ с помощью проточной цитофлуориметрии

Анализ с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) показал, что клетки МСК из ЗТМ экспрессируют мРНК генов *oct4*, нуклеостемина, нестина, щелочной фосфатазы, виментина, β 3-тубулина и теломеразы человека, но не остеокальцина и нейрофиламента низкой молекулярной массы (*nfl*), которые являются специфическими маркерами для остеоцитов и нейронов, соответственно. Кроме того, анализ ПЦР в режиме реального времени показал, что клетки МСК из ЗТМ, по сравнению с ЭСК (используемых в качестве положительного контроля), экспрессируют мРНК важных для развития генов транскрипционных факторов *sox2*, *c-myc* и особенно высокий уровень *klf4*, в то же время выявил низкий уровень экспрессии мРНК генов *oct4* и *nanog*.

Иммуноцитохимический анализ показал положительную окраску клеток МСК из ЗТМ с АТ к Klf4, c-Myc, Oct4, нестина, нуклеостемина и Sox2. После остеогенной индукции дифференцированные клетки МСК из ЗТМ оказались иммунопозитивными на остео-специфичный коллаген типа I и формировали кальциевые отложения, окрашиваемые методом van Kossa. После нейрогенной индукции дифференцирующиеся клетки МСК из ЗТМ показали нейроноподобную морфологию и оказались иммунопозитивными на β 3-тубулин. Адипогенную дифференцировку клеток МСК из ЗТМ подтвердило наличие клеток с морфологией аналогичной жировым клеткам, образующихся при дифференцировке в соответствующей среде.

Таким образом, было показано, что ткани зачатка зуба подростков содержат стволовые клетки, которые могут быть выделены и поддержаны в культуре *in vitro*. По морфологии и способности к дифференцировке полученные клетки МСК из ЗТМ относятся к мультипотентным стволовым клеткам, аналогичным мезенхимным стволовым клеткам. Высокий уровень экспрессии факторов транскрипции, участвующих в поддержании эмбриональных стволовых клеток в плюрипотентном состоянии, указывает на малодифференцированное состояние клеток.

Влияние длительного криоконсервирования стволовых клеток из зачатка зуба человека на нейропротекторные свойства клеток

После 6 месяцев криоконсервации при -80°C жизнеспособность клеток МСК из ЗТМ составила $90 \pm 2,5\%$. Морфология клеток соответствовала таковой у контрольной линии клеток МСК из ЗТМ, не подвергавшихся заморозке. Уровень пролиферации клеток МСК из ЗТМ, подвергшихся заморозке, соответствовал уровню пролиферации клеток МСК из ЗТМ, не

подвергавшихся криоконсервации. Как показал анализ, с помощью проточной цитофлуорометрии замороженные клетки экспрессируют CD маркеры, характерные для МСК, CD29, CD73, CD90, CD105 и CD166, но не гематопозитические маркеры, такие как CD14, CD34, CD45 и CD133 (рис. 1). После разморозки клетки МСК из ЗТМ поддерживались в культуре клеток в течение 10 пассажей с сохранением нормального кариотипа. Анализ уровня экспрессии генов *sox2*, *c-myc*, *klf4*, *oct4* и *nanog*, а также способность клеток МСК из ЗТМ к дифференцировке в адипо-, остео- и нейро-генно направлении у криоконсервированных клеток соответствовал таковому у исходных клеток.

Таким образом было показано, что клетки МСК из ЗТМ могут храниться замороженными при -80 °С в течение как минимум 6 месяцев без потери своих функциональных свойств. Длительная заморозка МСК не повлияла на экспрессию поверхностных антигенов, уровень мРНК ключевых генов, участвующих в поддержании эмбриональных стволовых клеток в плюрипотентном состоянии, и потенциал дифференцировки. Кроме того, замороженные МСК из ЗТМ оказывали нейро-протекторный эффект *in vitro* на модели клеток нейробластомы. Все эти выводы показывают, что длительное хранение МСК из ЗТМ при низких температурах – недорогой подход к сохранению клеток для возможного применения в будущем.

Влияние неионного блок-сополимера (Плуроника) P85 на пролиферацию стволовых клеток зачатка третьего моляра человека *in vitro*

На сегодняшний день внимание исследователей привлекают полимерные наноносители, которые могут быть использованы в качестве векторов доставки лекарственных препаратов. Один из перспективных классов полимеров – неионные полиэфирные белок-сополимеры (Плуроники). Несмотря на достигнутый прогресс влияние Плуроников на биологические свойства стволовых клеток человека остается малоизученным. В связи с этим важно установить влияния Плуроника P85 на пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток человека.

Культуру клеток МСК из ЗТМ инкубировали с Плуроником P85 в течение 24 и 72 часов. Морфологический анализ МСК из ЗТМ через 24 часа показал, что в концентрации 1% Плуроник P85 оказывает выраженное цитотоксическое действие, в концентрации 0,1% существенно влияет на морфологию клеток и не оказывает существенного влияния на морфологию

МСК в концентрации 0,01%. Анализ жизнеспособности клеточных культур с помощью MTS-теста подтвердил цитотоксическое действие Плуроника Р85 в концентрациях 0,1–1% (рис. 2). Концентрации Плуроника Р85 0,0001–0,01% не приводили к гибели клеток. Интересно, что в концентрациях Плуроника Р85 0,001–0,01% мы наблюдали значительное увеличение жизнеспособности клеточных культур (42–50% соответственно) через 72 часов инкубации, что, по-видимому, связано с повышением пролиферации стволовых клеток.

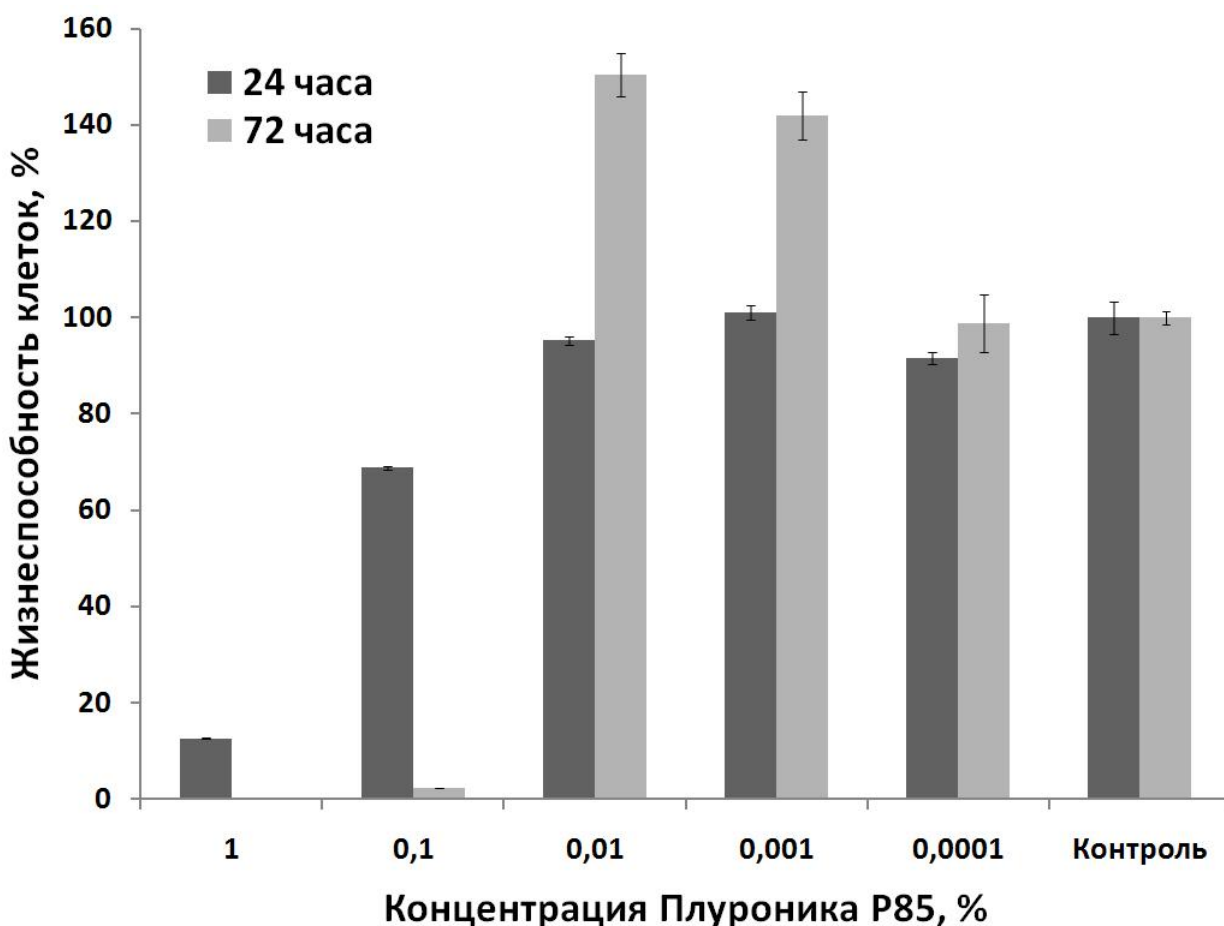


Рис. 2. Влияние Плуроника Р85 на пролиферацию мультипотентных стволовых клеток из третьих моляров человека *in vitro*. Жизнеспособность МСК из ЗТМ определяли с помощью MTS-теста 24 и 72 часа после добавления в культуральную среду Плуроника Р85 в конечной концентрации 0,0001–1% (вес/объем). Жизнеспособность культуры клеток без добавления Плуроника Р85 принята за 100%

Исследование влияния Плуроника Р85 на дифференцировку МСК из ЗТМ показало, что концентрация 0,01% оказывает наивысший стимулирующий эффект на пролиферацию и остеогенную дифференцировку МСК из ЗТМ. Определение активности щелочной фосфатазы с помощью

колориметрического метода показало, что активность фермента в клетках, предварительно обработанных Плуроником Р85 в концентрации 0,01% в течение 24 часов с последующим инкубированием в дифференцировочной среде в течение 7 дней, выше, чем в клеточной культуре без инкубации в соответствующей среде. Также наблюдалось значительное увеличение уровня экспрессии мРНК гена остеонектина.

Таким образом, впервые показано, что Плуроник Р85 оказывает стимулирующий эффект на пролиферацию стволовых клеток из зачатков третьих моляров человека. Кроме того, мы выяснили, что предварительная инкубация Плуроника Р85 повышает эффективность остеогенной дифференцировки МСК из ЗТМ. Полученные данные могут быть применены в тканевой инженерии при экспансии МСК *ex vivo* с последующей дифференцировкой в остеогенном направлении.

Исследование взаимодействия стволовых и опухолевых клеток человека при совместном ко-культивировании на различных биологических субстратах

При совместном ко-культивировании меченые красителями РКН26 или РКН67 клетки МСК из ЗТМ и SH-SY5Y были легко различимы по своему уникальному флуоресцентному излучению. Несмотря на то что обе клеточные популяции вносили в ко-культуру одновременно в форме моноклеточной суспензий, мы наблюдали быструю самоорганизацию клеток МСК из ЗТМ и SH-SY5Y, напоминающую каналы и островки (рис. 3). Данная модель напоминает гистологический срез тканей с метастазами опухолей и тем самым может рассматриваться как упрощенная 2-х мерная *in vitro* модель опухолей. Аналогичные органо-типические системы могут быть получены путем тонких срезов тканей, содержащих опухоли, однако, совместные ко-культуры позволяют получить более воспроизводимые результаты благодаря устойчивым свойствам самоорганизации определенных клеточных популяций. Поскольку предложенная 2-х мерная модель ко-культуры обладает большей сложностью по сравнению с моноклеточными моделями опухолей и в то же время проста в создании и интерпретации, ее использование для более точного моделирования микроокружения опухоли может обеспечить более реалистичную модель для скрининга лекарственных препаратов.

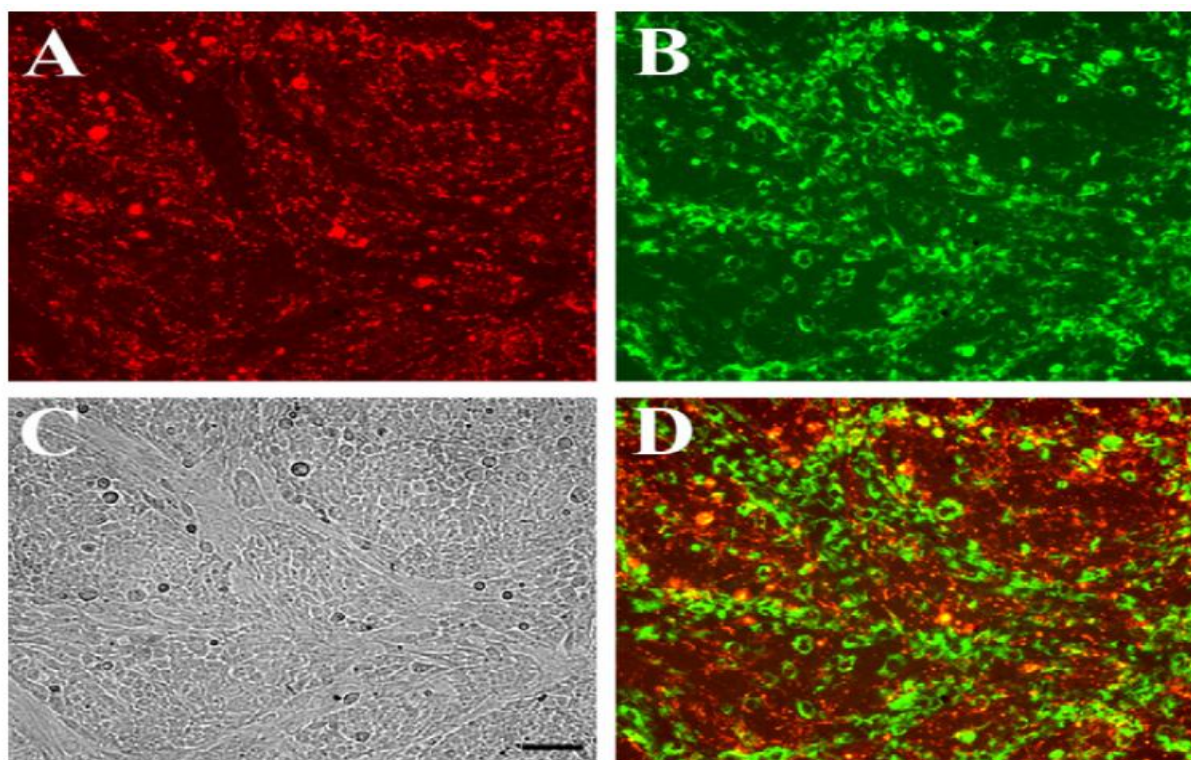


Рис. 3. Клетки МСК из ЗТМ и SH-SY5Y после трех дней совместного ко-культивирования. Наблюдается самоорганизацию клеток, при которой МСК из ЗТМ образовали канало-подобную структуру (зеленая флуоресценция), а клетки SH-SY5Y – островково-подобную структуру (красная флуоресценция). Масштаб: 100 мкм. (А) SH-SY5Y клетки помечены РКН26 (красная флуоресценция). (В) Клетки МСК из ЗТМ помечены РКН67 (зеленая флуоресценция). (С) Фазово-контрастная световая микроскопия. (D) Совмещение изображений панелей А и В

Для того, чтобы определить влияние компонентов внеклеточного матрикса на самоорганизацию совместных ко-культур, клетки МСК из ЗТМ и SH-SY5Y высевали в различных концентрациях на поверхность культурального пластика, покрытого поли-L-лизином, Матригелем, фибронектином, желатином или коллагеном. Никаких существенных различий не наблюдалось в самоорганизации совместных ко-культур на поверхностях без покрытия и поверхностях, покрытых поли-L-лизином, фибронектином, желатином или коллагеном. Было отмечено, что некоторые клетки флуоресцировали одновременно в зеленом и красном свете, что свидетельствует о слиянии стволовых и раковых клеток.

Другой тип самоорганизации совместных ко-культуры клеток МСК из ЗТМ и нейро-бластомы можно было наблюдать на тонком слое Матригеля. Ядро из сгруппировавшихся одиночных клеток состояло из МСК из ЗТМ и

было окружено плоским ореолом клеток SH-SY5Y (рис. 4). В течение первых нескольких часов совместного ко-культивирования на Матригеле МСК из ЗТМ сформировали переходную капилляро-подобную структуру, характерную для эндотелиальных клеток, но уже в течение следующих дней клетки формировали стабильную тарелко-подобную структуру. Этот вид самоорганизации ко-культуры может отражать характер взаимодействия опухолевых и стволовых клеток во время метастазирования опухоли. Ранее рядом исследователей было показано, что кроветворные клетки-предшественники, полученные из костного мозга, могут формировать кластеры-ниши для заселения опухолевыми клетками при метастазировании (Kaplan et al., 2005). Хотя клетки SH-SY5Y продемонстрировали медленный рост на Матригеле, они активно росли вокруг агрегатов МСК из ЗТМ при совместном ко-культивировании.

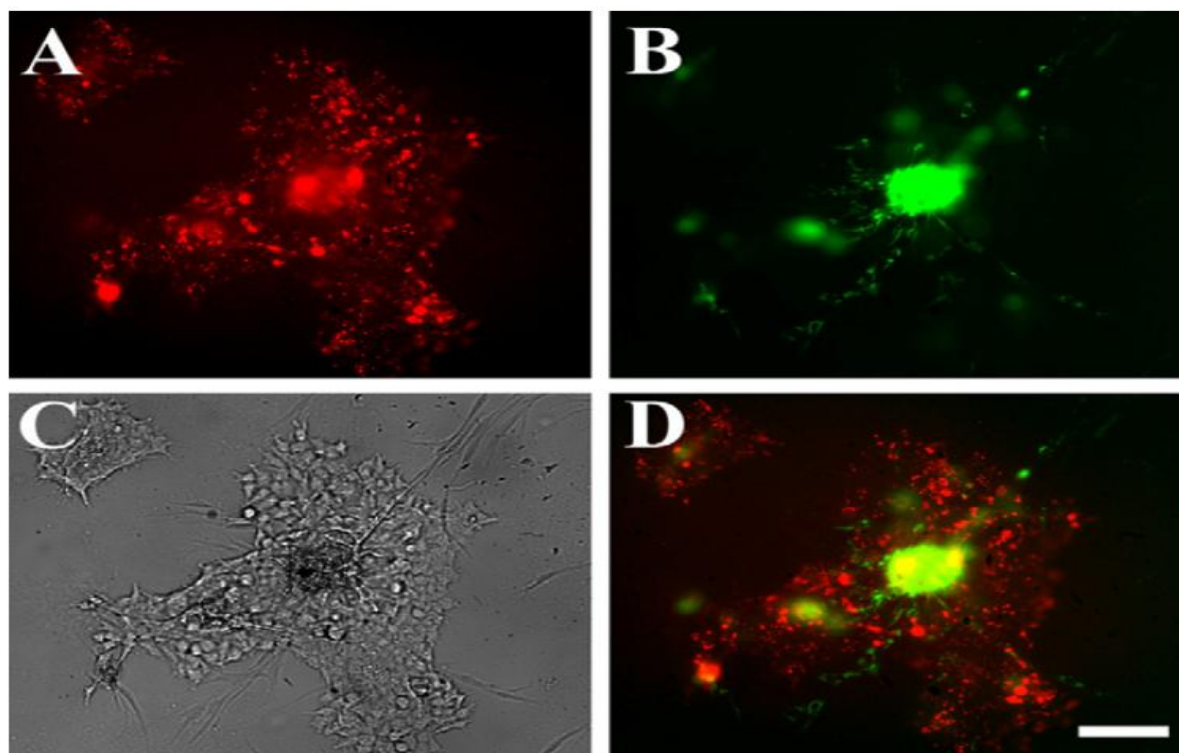


Рис. 4. Клетки МСК из ЗТМ и SH-SY5Y после четырех дней совместного ко-культивирования на Матригеле. Блюдце-подобная самоорганизация – структура состоит из плотного ядра клеток МСК из ЗТМ (зеленая флуоресценция) и окружающего его ореола клеток SH-SY5Y (красная флуоресценция). Масштаб: 100 мкм. (А) SH-SY5Y, меченые РКН26 (красная флуоресценция). (В) МСК из ЗТМ, меченные РКН67 (зеленая флуоресценция). (С) Фазово-контрастная световая микроскопия. (D) Совмещение изображений панелей А и В

Чтобы определить влияние клеток МСК (помечены зеленым флуоресцентным красителем PKH67) на жизнеспособность клеток SH-SY5Y (не помечены), ко-культуры подвергались окислительному стрессу, вызванному добавлением в культуральную среду H_2O_2 . Жизнеспособность клеток отдельных клеточных популяций проверяли путем окрашивания пропидием иодидом (PI) с последующим анализом с помощью проточной цитометрии (рис. 5). Такой подход позволил отслеживать обе популяции по интенсивности зеленой флуоресценции. Метод PI-окрашивания использовали для определения процента погибших клеток. Наши результаты показывают, что в условиях окислительного стресса в присутствии МСК жизнеспособность клеток нейро-бластомы SH-SY5Y увеличивалась в 2,1–3,5 раза (рис. 5).

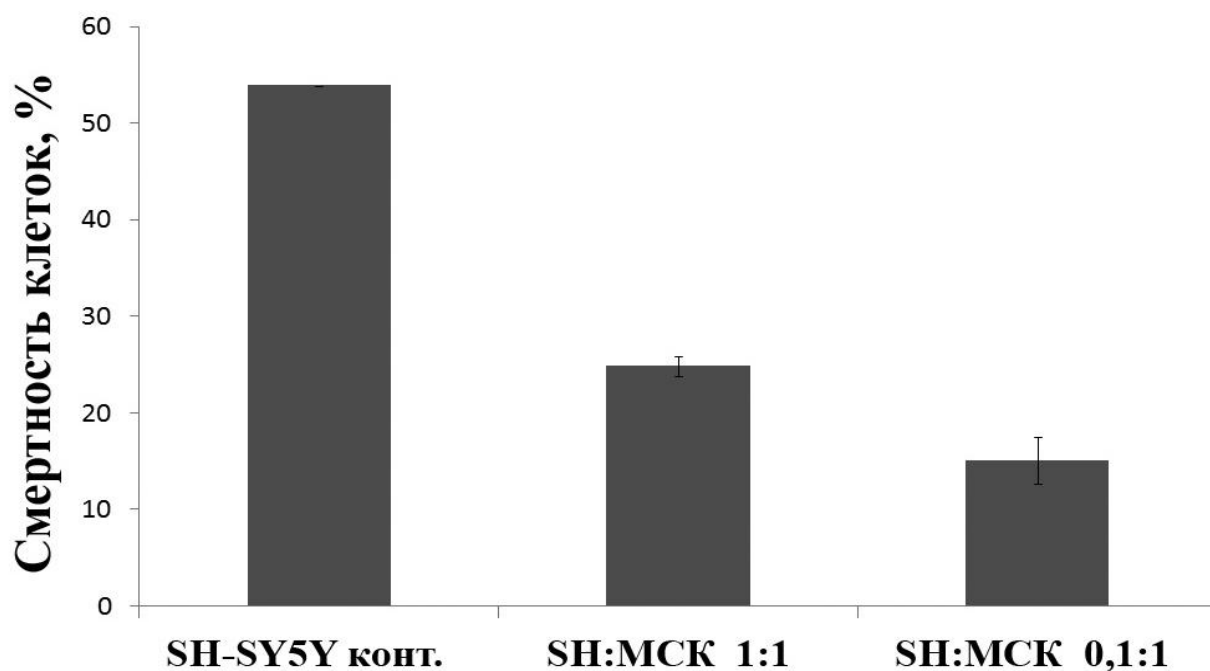


Рис. 5. Определение жизнеспособности МСК из ЗТМ при совместном ко-культивировании с клетками SH-SY5Y после 20 часов обработки H_2O_2 с помощью проточной цитометрии.

Таким образом, мы разработали эффективную систему для исследования отдельных популяций опухолевых и стволовых клеток *in vitro* в условиях совместной ко-культуры с помощью прижизненной окраски флуоресцентными красителями и продемонстрировали самоорганизацию

раковых и стволовых клеток при культивировании на поверхностях с различным покрытием. Полученные данные могут быть использованы в различных областях исследования онкологических заболеваний, тканевой инженерии и биотехнологии, в которых требуется самосборка различных типов клеток в монослой или тонкие пленки.

ВЫВОДЫ

1. Полученные культуры стволовых клеток из зачатков пульпы третьих моляров человека по экспрессии CD-маркеров и способности к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и нейрогенном направлении аналогичны мезенхимным стволовым клеткам. В них выявляется высокий уровень мРНК генов факторов транскрипции, что подтверждает их недифференцированное состояние.

2. Неионный блок-сополимер Плуроник Р85 в концентрации 0,01% повышает жизнеспособность стволовых клеток из зачатков пульпы третьих моляров человека и усиливает их остеогенную дифференцировку.

3. Стволовые клетки из зачатков третьих моляров человека способны к длительной криоконсервации и долговременному хранению при низких температурах с сохранением их основных биологических свойств, таких как пролиферация, дифференцировка и сохранение исходного кариотипа.

4. При совместном ко-культивировании клеточных популяций стволовых клеток из зачатков пульпы третьих моляров человека и нейробластомы SH-SY5Y на различных культуральных поверхностях, модифицированных компонентами внеклеточного матрикса или их заменителями, происходит функциональное взаимодействие и спонтанная самоорганизация клеток в различные двумерные структуры: на поли-L-лизине, фибронектине, желатине, коллагене и немодифицированном пластике – каналоподобные структуры из стволовых клеток и островковые структуры из клеток SH-SY5Y; на Матригеле – ядро из сгруппировавшихся стволовых клеток, окруженное плоским ореолом клеток SH-SY5Y.

Список основных публикаций по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций:

1. *Блатт Н.Л.* Влияние Плуроника P85 на пролиферацию и остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток человека *in vitro* / Н.Л. Блатт, М.Э. Ялвач, А.К. Шафигуллина, И.И. Салафутдинов, А.П. Киясов, Р.Ф. Масгутов, Ю.Г. Штырлин, А.В. Кабанов, А.А. Ризванов // Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия. – 2010. – Т.5, №3. – С. 66–70.

2. *Rizvanov A.A.* Interaction and self-organization of human mesenchymal stem cells and neuro-blastoma SH-SY5Y cells under co-culture conditions: a novel system for modeling cancer cell micro-environment / A.A. Rizvanov, M.E. Yalvaç, A.K. Shafigullina, I.I. Salafutdinov, N.L. Blatt, F. Sahin, A.P. Kiyasov, A. Palotás // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2010. – Vol.76, №2. – P. 253–259.

3. *Yalvac M.E.* Neuroprotective Effect of Human Tooth Germ Stem Cells after Long Term Cryopreservation / M.E. Yalvac, M. Ramazanoglu, M. Tekguc, O.F. Bayrak, A.K. Shafigullina, I.I. Salafutdinov, N.L. Blatt, A.P. Kiyasov, F. Sahin, A. Palotás, A.A. Rizvanov // Current Neurovascular Research. – 2010. – Vol.7, №1. – P.49–58.

Список основных докладов и материалов конференций по теме диссертации:

1. *Блатт Н.Л.* Долговременная криоконсервация и хранение мезенхимных стволовых клеток из зачатков зубов мудрости человека / Н.Л. Блатт, М.Э. Ялвач, А.К. Шафигуллина, И.И. Салафутдинов, А.А. Ризванов // Материалы XVI Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2011. – С. 124.

2. *Блатт Н.Л.* Влияние неионного блок-сополимера (плюроника) P85 на пролиферацию стволовых и раковых клеток человека *in vitro* / Н.Л. Блатт, А.К. Шафигуллина, И.И. Салафутдинов, А.А. Ризванов // XV Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2010. – С. 267–268.

3. *Шафигуллина А.К.* Ко-культура раковых и мезенхимных стволовых клеток – новая тест-система для скрининга противоопухолевых препаратов / А.К. Шафигуллина, Н.Л. Блатт, И.И. Салафутдинов, А.П.

Киясов, А.А. Ризванов // Материалы V Международной (XIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – Москва, 18 марта 2010. – С. 100–101.

4. *Shafigullina A.K.* Self organization of mesenchymal stem cells and neuroblastoma SH-SY5Y cells during co-culture on different coated surfaces / A.K. Shafigullina, M.E. Yalvac, I.I. Salafutdinov, N.L. Blatt, F.Sahin, A.P. Kiyasov, A. Palotás, A.A. Rizvanov // The 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders». – Kazan, 2009. – P. 112.

5. *Шафигуллина А.К.* Ко-культивирование раковых клеток SH-SY5Y нейробластомы человека и мезенхимных стволовых клеток на различных биологических покрытиях / А.К. Шафигуллина, Н.Л. Блатт, М.Э. Ялвач, А.П. Киясов, А.А. Ризванов // Международная научная школа для молодежи «Инновационные технологии в здравоохранении: молекулярная медицина, клеточная терапия, трансплантология, реаниматология, нанотехнологии» Международной научной конференции «Инновационные технологии в реальном секторе экономики», Заседание Экспертного Совета по программе «УМНИК», 2009. – Екатеринбург, 9–12 ноября, 2009. – С. 226–227.

6. *Шафигуллина А.К.* Система ко-культивирования мезенхимных стволовых клеток и клеток нейробластомы SH-SY5Y: новая модель *in vitro* для скрининга биологической активности веществ / А.К. Шафигуллина, Н.Л. Блатт, А.А. Ризванов // «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» Всероссийская научная школа-конференция для молодежи, 2009. – Москва, 21–26 сентября 2009. – С. 77–78.

7. *Шафигуллина А.К.* Влияние биополимерной модификации поверхностей на самоорганизацию стволовых и раковых человека / А.К. Шафигуллина, Н.Л. Блатт, А.А. Ризванов // Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Структура и динамика молекулярных систем», 2009. – Казань, 5–8 октября, 2009. – С. 56.

8. *Шафигуллина А.К.* Взаимодействие мезенхимных стволовых клеток и раковых клеток при ко-культивировании на различных биологических субстратах / А.К. Шафигуллина, М.Э. Ялвач, Н.Л. Блатт, А.П. Киясов // Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-летию со дня

рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова, 28 сентября – 1 октября. – Москва – Пущино, 2009. – С. 256–257.

9. *Ризванов А.А.* Эффект эктопической экспрессии факторов транскрипции Oct4, Sox2, Klf4 и cMyc в моноклеарной фракции пуповинной крови человека на уровень мРНК генов NANOG, Oct4, Sox2, Klf4 и cMyc / А.А. Ризванов, А.К. Шафигуллина, Н.Л. Блатт, Н.И. Ланник, И.И. Салафутдинов // XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2009. – С. 173.

10. *Шафигуллина А.К.* Сравнительный анализ экспрессии мРНК факторов транскрипции Oct4, NANOG, Sox2, Klf4 и cMyc в клеточных культурах пульпы коренных зубов и зачатков третьих моляров человека / А.К. Шафигуллина, И.И. Салафутдинов, Н.Л. Блатт, Н.И. Ланник, А.А. Ризванов // XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2009. – С. 177.

11. *Шафигуллина А.К.* Экспрессия генов Oct4, Sox2, NANOG, cMyc и Klf4 в культуре клеток, выделенных из зачатков третьих моляров человека / А.К. Шафигуллина, М.Э. Ялвач, С.Ш. Парпиева, Н.И. Ланник, Н.Л. Блатт, И.И. Салафутдинов, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы II Международной научно-практической конференции. – Казань, 2008. – С. 144.

12. *Парпиева С.Ш.* Влияние экспрессии рекомбинантного гена Oct4 на уровень экспрессии мРНК генов на уровень мРНК генов NANOG, Sox2, Klf4 и cMyc в мезенхимных стволовых клетках человека / С.Ш. Парпиева, А.К. Шафигуллина, М.Э. Ялвач, Н.И. Ланник, Н.Л. Блатт, И.И. Салафутдинов, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы II Международной научно-практической конференции. – Казань, 2008. – С. 101.

13. *Парпиева С.Ш.* Клонирование человеческих генов Oct4, Sox2, cMyc и Klf4, используемых для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. / С.Ш. Парпиева, А.К. Шафигуллина, Н.В. Кудряшова, Н.Л. Блатт, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // I Всероссийский конгресс студентов и аспирантов биологов «Симбиоз-Россия 2008»: сборник статей. – Казань, 2008. – С. 23.