

Васютин Игорь Алексеевич

**Изучение гистогенетической принадлежности клеток, выделенных из мочи, и
перспективы их применения в тканевой инженерии**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Научный руководитель:

Кандидат медицинских наук

Людуп Алексей Валерьевич

Научный консультант:

Член-корреспондент РАН,

доктор медицинских наук, профессор

Кузнецов Сергей Львович

Официальные оппоненты:

Баклаушев Владимир Павлович – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, заместитель генерального директора по научной работе и медицинским технологиям;

Астрелина Татьяна Алексеевна – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна», Центр биомедицинских технологий, руководитель Центра.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 15 марта 2021 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, улица Трубецкая, дом 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации (www.sechenov.ru)

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент



Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Стриктурой уретры является сужение мочеиспускательного канала вследствие ишемического спонгиоза (Latini et al. 2014). Это заболевание представляет собой значимую медицинскую проблему, так, его распространенность в развитых странах может достигать 6 случаев на 1000 лиц мужского пола (Santucci et al., 2007). Выбор хирургического лечения зависит от протяженности и локализации стриктуры, выраженности спонгиоза, предшествующего лечения и других факторов. При хирургическом лечении чаще всего используется анастомотическая или, в случае протяженных стриктур, заместительная уретропластика. При заместительной уретропластике в качестве источника лоскутов и трансплантатов выступают различные ткани пациента — генитальная или экстрагенитальная кожа, влагалищная оболочка яичка, слизистая щеки (Lee and Kim, 2013; Коган, 2010). Несмотря на то, что уретропластика с использованием аутологичных тканей пациента продемонстрировала достаточно высокую эффективность, существуют по крайней мере две проблемы, которые диктуют поиск альтернативных источников трансплантатов, а именно морбидность в донорской зоне и дефицит тканей при протяженных и рецидивных стриктурах мочеиспускательного канала.

Тканевая инженерия — это направление регенеративной медицины, основной целью которого является создание биоэквивалентов органов и тканей для клинического применения с использованием клеток, материалов и сигнальных молекул. За 30 лет существования инновационного направления был достигнут значительный прогресс в разработке различных подходов создания биоэквивалентов органов, а также проведен ряд клинических исследований продуктов, изготовленных с использованием технологий тканевой инженерии (Atala et al., 2012). Тканеинженерная конструкция принципиально представляет из себя биосовместимый материал необходимой формы, называемый скаффолдом, с засеянными на него живыми клетками. Скаффолд несет структурную функцию конструкции, определяет ее форму, обеспечивает механические свойства, а также представляет субстрат для прикрепления, пролиферации и нормальной жизнедеятельности клеток (Tomlins, 2016). В качестве клеток, как правило, используются прогениторные или дифференцированные клетки того органа, для пластики которого планируется использовать данную конструкцию (Atala et al., 2012). Для того, чтобы исключить иммунный ответ на компоненты конструкции, скаффолд должен быть изготовлен из инертного для иммунной системы материала, а источником клеток должен быть сам пациент, для которого изготавливается конструкция. Для получения клеток, как правило, используется биопсия небольшого участка здоровой ткани пациента, из которой затем с помощью методов клеточной биологии получают культуры клеток. Дальнейшее культивирование клеток в

лабораторных условиях производят для получения достаточного количества клеток для заселения скаффолда.

В случае поражения значительного участка уретры восполнить нехватку ткани для заместительной уретропластики можно при помощи методов тканевой инженерии путем создания трансплантата необходимого размера. В тканеинженерном трансплантате необходимо использование эпителиальных клеток для восстановления непроницаемого барьера между просветом мочеиспускательного канала и нижележащими тканями. Дополнительно могут быть использованы фибробласты или гладкомышечные клетки (ГМК) для скорейшего восстановления подслизистой основы и мышечного слоя, подавления фиброзирования конструкции и поддержания клеточного гомеостаза уретрального эпителия (de Kemp et al., 2015). Слизистая мочеиспускательного канала выстлана уретральным многорядным эпителием, который по своему эмбриональному происхождению и свойствам схож с переходным эпителием мочевого пузыря. За эпителием мочевого пузыря и мочеиспускательного канала следует собственная пластинка, нечетко отделенная от подслизистой основы, за которой следует мышечная оболочка, состоящая из множества пучков ГМК. Таким образом, наиболее подходящим источником клеток для тканеинженерного трансплантата для уретропластики является мочевой пузырь, так как гистологическое строение стенки мочевого пузыря во многом схоже с гистологическим строением мочеиспускательного канала (De Filippo et al., 2015). Однако биопсия мочевого пузыря представляет собой некомфортное для пациента оперативное вмешательство, требующее общей анестезии, и потенциально сопряженно с осложнениями, поэтому наличие более доступного источника клеток для тканевой инженерии трансплантата для уретропластики значительно упростит процесс создания конструкции.

Одним из альтернативных подходов для получения клеток для тканевой инженерии является дифференцировка аутологичных стволовых клеток в необходимом направлении. Так, целью ряда исследований было получение клеток для тканевой инженерии органов нижних мочевых путей — переходного эпителия и ГМК — через дифференцировку постнатальных стволовых клеток. Между тем постнатальные стволовые клетки имеют ограниченный дифференцировочный потенциал. К примеру, для мезенхимальных стромальных клеток (МСК) была показана возможность дифференцировки в клетки органов мезенхимального происхождения — клетки костной, хрящевой, жировой ткани, ГМК, в то время как попытка дифференцировки МСК в клетки переходного эпителия не показала удовлетворительных результатов. Поэтому данный тип стволовых клеток, получивший широкое распространение в регенеративной медицине, для тканевой инженерии мочеиспускательного канала может быть использован только как источник ГМК (Sharma et al., 2010).

Недавние исследования показали, что нормальная моча здоровых взрослых людей содержит небольшую популяцию «рисоподобных» клеток с высоким пролиферативным потенциалом, названных стволовыми клетками, выделенными из мочи (СКМ). СКМ коэкспрессируют как маркеры МСК, так и прогениторных эпителиальных клеток, имеют время удвоения популяции 20–30 ч, и могут быть культивированы на протяжении 20 пассажей (Zhang et al., 2008). Предполагается, что стволовые клетки в моче являются стволовыми клетками париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана, так как и те, и другие имеют одинаковые профили экспрессии маркеров коры почки (CD224, CD13, NR3C2 и *paх8*) (Bharadwaj et al., 2013). СКМ имеют широкий дифференцировочный потенциал, а в контексте тканевой инженерии нижних мочевых путей эти клетки могут быть дифференцированы в клетки переходного эпителия и ГМК. Культивирование СКМ в среде с высокой концентрацией эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF) на протяжении 14 дней индуцирует экспрессию уроплакинов и цитокератинов (Bharadwaj et al., 2011). Дополнительным подтверждением дифференцировки в клетки переходного эпителия служит положительный функциональный тест на способность полученных клеток образовывать барьер. Дифференцировка СКМ в ГМК проводится культивированием клеток в среде с тромбоцитарным фактором роста (platelet-derived growth factor, PDGF) и трансформирующим фактором роста $\beta 1$ (transforming growth factor, TGF- $\beta 1$) на протяжении 14 дней. Полученные клетки экспрессируют специфические маркеры ГМК и становятся способными к сокращению (Bharadwaj et al., 2011).

В силу того, что СКМ могут быть неинвазивно получены для любого взрослого человека, могут содержаться в культуре, имеют малое время удвоения популяции, а также, по данным литературы, имеют потенциал к дифференцировке в клетки переходного эпителия и ГМК, данный тип клеток послужил предметом данного диссертационного исследования. Для оценки перспектив применения СКМ в регенеративной медицине необходимо уточнить характеристики культуры СКМ, их гистологическую принадлежность, а также степень дифференцировки в клетки переходного эпителия и ГМК.

Цель исследования

Охарактеризовать стволовые клетки, выделенные из мочи, с точки зрения их гистогенетической принадлежности и оценить возможность их применения в тканевой инженерии органов нижних мочевых путей.

Задачи исследования

1. Отработать метод получения стволовых клеток из мочи, определить их иммунофенотипический профиль и особенности роста в культуре.
2. Оценить гистогенетическую принадлежность стволовых клеток, выделенных из мочи, по профилю экспрессии поверхностных маркеров.
3. Выделить первичные культуры клеток переходного эпителия и гладкомышечных клеток мочевого пузыря и охарактеризовать данные культуры по профилю экспрессии внутриклеточных маркеров.
4. Разработать и оптимизировать способ дифференцировки стволовых клеток, выделенных из мочи, в эпителиальные клетки нижних мочевых путей и гладкомышечные клетки. Сравнить профили экспрессии маркеров дифференцировки между первичными культурами клеток переходного эпителия и гладкомышечных клеток и культурами стволовых клеток, выделенных из мочи, после дифференцировки.
5. Произвести оценку пролиферации стволовых клеток, выделенных из мочи, на скаффолде на основе коллагена первого типа.

Научная новизна

В настоящей работе впервые проведена характеристика СКМ с точки зрения их гистологической принадлежности. Показано, что СКМ являются эпителиальными по своей природе. Использование поверхностных маркеров, описанных для камбиальных элементов нефрона, показало практически идентичные профили экспрессии данных маркеров у клеток капсулы Шумлянско-Боумана и проксимальных канальцев и у СКМ. Кроме того, по результатам данного исследования впервые описана фенотипическая гетерогенность СКМ.

Также в данной работе получены данные о возможности СКМ дифференцироваться в клетки переходного эпителия и ГМК. Для анализа дифференцировки культур клеток было проведено иммуноцитохимическое окрашивание на наличие экспрессии характеризующих маркеров до и после дифференцировки с последующим компьютерным анализом изображений флуоресцентной микроскопии. Компьютерный анализ изображений позволил получить точные количественные данные внутриклеточного содержания маркеров клеток переходного эпителия и ГМК. Исходя из полученных данных не было найдено признаков дифференцировки СКМ в клетки переходного эпителия под воздействием высоких концентраций EGF, что ставит под сомнение существовавшие ранее представления о потентности СКМ.

Показана возможность длительного выживания и пролиферации СКМ на скаффолде для тканевой инженерии.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты данной работы позволяют предположить источник СКМ в организме, а также описывают гистогенетическую принадлежность и фенотипическую гетерогенность СКМ. Полученные данные могут послужить фундаментом для дальнейших исследований СКМ как объекта клеточных технологий, а также проливают свет на некоторые вопросы, касающиеся биологии и функции стволовых клеток мочевыделительной системы.

Отсутствие признаков дифференцировки СКМ в клетки переходного эпителия под воздействием высокой концентрации EGF диктует необходимость пересмотреть данный подход при дальнейших исследованиях СКМ как источника клеток переходного эпителия в тканевой инженерии нижних мочевыводящих путей. Между тем данные о гистогенетическом происхождении СКМ и их способность к пролиферации на скаффолде на протяжении длительного времени говорят о перспективности данного типа клеток в тканевой инженерии.

Положения, выносимые на защиту

1. Стволовые клетки, выделяемые из мочи, представляют из себя гетерогенную клеточную популяцию, имеют эпителиальную природу и являются прогениторными клетками капсулы Шумлянско-Боумана и проксимальных канальцев почки.
2. Стволовые клетки, выделяемые из мочи, способны к дифференцировке в гладкомышечные клетки *in vitro* под воздействием тромбоцитарного фактора роста и трансформирующего фактора роста $\beta 1$ на протяжении 10 дней.
3. Стволовые клетки, выделяемые из мочи, не способны к дифференцировке в клетки переходного эпителия *in vitro* под воздействием высокой концентрации эпидермального фактора роста на протяжении 10 дней.
4. Стволовые клетки, выделяемые из мочи, способны к длительному выживанию и пролиферации на скаффолде на основе коллагена для тканевой инженерии.

Внедрение результатов диссертационного исследования в практику

Результаты диссертационной работы были включены в образовательный и научно-исследовательский процесс кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины общая гистология и цитология, раздела, посвященного системе органов мочеобразования и мочевыведения, читаемого студентам по направлению подготовки 31.05.01 Лечебное дело (уровень специалитета).

Апробация работы

Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского, ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 24 сентября 2020 г., протокол №1.

Личный вклад

Автором были проведены отработка протокола выделения СКМ добровольцев, проточная цитометрия, серийное культивирование, выделение первичных культур клеток переходного эпителия и ГМК из кадаверного материала мочевого пузыря, иммуноцитохимические исследования, флюоресцентная микроскопия, а также оценка жизнеспособности культуры СКМ на скаффолде. Статистический анализ полученных данных, описание и обсуждение результатов, оформление диссертации и автореферата выполнены автором самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие в написании статей и тезисов и их подготовке к публикации в научных изданиях.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 6 научных работ, 5 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 5 статей в международных библиографических базах SCOPUS и Web of Science.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА РАБОТЫ

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 114 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием использованных материалов и методов, главы «Результаты», заключения и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 141 отечественный и зарубежный источник. Полученные данные сведены в 14 таблиц и проиллюстрированы 21 рисунком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью выделения стволовых клеток из мочи в исследовании были взяты образцы мочи в объеме 200-300 мл на образец у 6 здоровых добровольцев обоего пола в возрасте от 21 до 57 лет. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (протокол № 06-19 от 15.05.2019). Добровольное информированное согласие на участие в исследовании было получено от всех добровольцев перед сдачей образцов мочи для выделения клеток.

Выделение клеток из мочи производили посредством двукратного центрифугирования при 1500 rpm в течение 5 мин с отбором надосадочной жидкости и ресуспендированием клеток в фосфатно-солевом буфере после первого центрифугирования. После второго центрифугирования надосадочную жидкость забирали с помощью аспиратора, а осадок, содержащий клетки, ресуспендировали в среде для культивирования СКМ. Среду с клетками переносили в 24-луночный культуральный планшет в объеме 1 мл на лунку. Первую замену среды осуществляли через 3 дня после посадки клеток, дальнейшую замену проводили каждые два дня. При достижении покрытия СКМ 20–30% поверхности лунки клетки пересеивали на 6-луночные культуральные планшеты для дальнейшего культивирования.

Проточная цитометрия

Для проведения проточной цитометрии для оценки экспрессии поверхностных маркеров использовали СКМ второго пассажа. Клетки трипсинизировали, отмывали и окрашивали флуоресцентными антителами против CD73, CD90, CD105, CD31, CD24, CD133, CD106, подокаликсина (BD Biosciences), CD34, CD45, CD29, CD44, CD54 и SSEA4 (Life Technologies, Inc.). Анализ флуоресценции проводили с использованием проточного цитофлуориметра BD Accuri™ C6, BD Biosciences и клеточного сортера MoFlo (Beckman Coulter).

Выделение клеток переходного эпителия и ГМК мочевого пузыря

Выделение клеток переходного эпителия и ГМК мочевого пузыря осуществляли из кадаверного материала мочевого пузыря человека. Фрагмент мочевого пузыря, содержащий слизистую оболочку и мышечный слой, отмывали в фосфатно-солевом буфере, после чего проводили выделение клеток. Для выделения клеток переходного эпителия, слизистую мочевого пузыря отделяли от мышечного слоя с помощью ножниц. Клетки переходного эпителия отделяли от ткани соскребанием их с поверхности слизистой лезвием скальпеля. Выделенные клетки вместе с культуральной средой переносили в 25 см² культуральные флаконы, культуральная поверхность которых была обработана поли-L-лизинном. Для культивирования клеток переходного эпителия использовали среда keratinocyte serum-free medium (KSFM), замену среды осуществляли каждые два дня. Для выделения ГМК использовался оставшийся мышечный слой мочевого пузыря. Сперва от фрагмента мышечного слоя с помощью ножниц удаляли остатки соединительной, жировой и васкулярной тканей. После этого фрагмент нарезали с помощью ножниц и скальпеля на мелкие кусочки ~1 мм диаметром, которые переносили на поверхность культуральной посуды, на которой кусочки оставались на 30 минут для прикрепления. По прошествии 30 минут в культуральную посуду с прикрепившимися кусочками мышечной ткани добавляли среду Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) с 10% fetal bovine serum (FBS). Смену среды осуществляли каждые два дня.

Дифференцировка

Для проведения дифференцировки в клетки переходного эпителия СКМ второго пассажа были посеяны на культуральную посуду в концентрации 2000–4000 кл/см² в среде, содержащей 30 нг/мл EGF. Дифференцировку проводили в течение 10 дней без пассирования. Смену среды осуществляли каждые два дня. Для дифференцировки в ГМК СКМ второго пассажа были посеяны на культуральную посуду в концентрации 500–1500 кл/см² в среде, содержащей 5 нг/мл PDGF-BB и 2,5 нг/мл TGF- β 1. Дифференцировку проводили в течение 10 дней без пассирования. Смену среды осуществляли каждые два дня.

Иммуноцитохимическое окрашивание

Для флуоресцентного окрашивания клетки в культуральных 24-луночных планшетах фиксировали с помощью 16% формальдегида, пермеабелизировали с помощью Тритона X-100, после чего инкубировали при 4°C в течение ночи с первичными антителами против цитокератинов (cytokeratin, CK) AE1/AE3, CK 7, CK 13 для оценки уротелиального фенотипа и против α -гладкомышечного актина (α -SMA), десмина и кальпонины для оценки гладкомышечного фенотипа. После инкубации с первичными антителами клетки отмывали и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC или Texas Red, в течение 1 ч при комнатной температуре.

Заселение биоматериала на основе коллагена

20 мкл среды для культивирования СКМ, содержащей СКМ второго пассажа в количестве 5×10^3 клеток, равномерно наносили на образцы пленки толщиной 20 мкм и площадью 1,96 см² на основе коллагена I типа, полученного из коровьей кожи (collagen cell carrier, CCC, Viscofan Bioengineering), находящийся в лунках 24-х луночного культурального планшета, после чего пленку с клетками оставляли на 1 час для адгезии клеток. По истечении 1 часа добавляли 1 мл среды для культивирования СКМ. Замену среды проводили каждые 2 суток. Оценку жизнеспособности СКМ в составе тканеинженерной конструкции проводили на 5, 10 сутки культивирования СКМ на образцах биоматериала с использованием реагента PrestoBlue. Дополнительно жизнеспособность клеток определяли окрашиванием Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific, США) с последующей визуализацией клеток на образцах с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM4000 B LED (Leica Microsystems, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первые колонии делящихся клеток были выявлены через 4-5 дней после выделения клеток. Динамика роста колоний СКМ значительно варьировала от клона к клону. К третьему пассажу (после 20-22 удвоений популяции) время удвоения популяции для культур СКМ

составило $1,44 \pm 0,528$ суток ($n=4$). Общее количество удвоений популяции для клонов СКМ с момента выделения клеток до вырождения культуры составило $32,4 \pm 5,50$. По мере нахождения клонов СКМ в культуре было отмечено заметное увеличение времени удвоения популяции после 4-5 пассажа (таблица 1). К моменту вырождения культуры СКМ заметно изменяли свою морфологию: отмечалось значительное увеличение размеров клеток (рисунок 1).

Таблица 1. Время удвоения популяции в зависимости от пассажа для 4 клонов СКМ

	Время удвоения популяции на пассаже 3 (дни)	Время удвоения популяции на пассаже 4 (дни)	Время удвоения популяции на пассаже 5 (дни)	Время удвоения популяции на пассаже 6 (дни)	Время удвоения популяции на пассаже 7 (дни)	Количество удвоений популяции (с нулевого пассажа)
Клон 2I243-104-D2	0,92	1,32	0,95	1,69	3,31	40,5
Клон I243-114-A3	1,57	2,71	7,50			30,4
Клон I273-124-C1	1,71	3,44				28,3
Клон I313-173-B3	2,43	1,92	9,21			30,3
Среднее $\pm$ СО	$1,66 \pm 0,619$	$2,35 \pm 0,924$	$5,89 \pm 4,360$			$32,4 \pm 5,50$

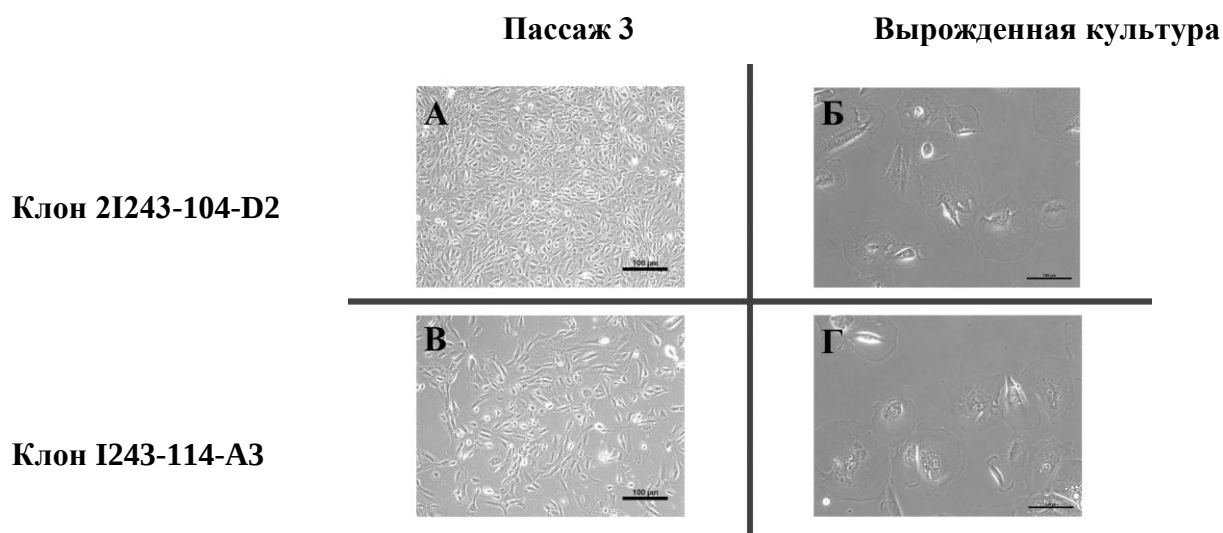


Рисунок 1. Микрофотографии культуры клонов СКМ на пассаже 3 (А, В) и после вырождения культуры (Б, Г).

Для оценки фенотипа СКМ как стволовых клеток были использованы маркеры различных тканеспецифичных стволовых клеток взрослого организма: маркеры МСК CD73, CD90, CD105, маркеры гематопозитических стволовых клеток CD34 и CD45, а также поверхностные маркеры, характерные для других стволовых клеток CD29, CD44 и CD54, и маркер, описанный для эмбриональных стволовых клеток, SSEA4. Для данного анализа были использованы четыре различных клон СКМ. СКМ показали средний уровень экспрессии маркеров МСК (Ме [Мин - Макс]): CD73 — 79,8% [67,5% – 99,2%], CD90 — 56,6% [10,2% – 99,6%], CD105 — 40,7% [25,7% – 74,2%]. Экспрессия маркеров гематопозитических стволовых клеток отсутствовала: CD34 <1,0% и CD45 <2,0%. СКМ показали высокий уровень экспрессии маркеров, характерных для других стволовых клеток: CD29 >99,0%, CD44 >99,0%, CD54 — 97,7% [95,5% – 99,0%], а также маркера эмбриональных столовых клеток SSEA4: >99,0%. Результаты проточной цитометрии СКМ представлены в таблице 2. Результаты экспрессии маркеров согласуются с данными, представленными ранее, и подтверждают, что фенотип полученных клеток соответствуют фенотипу СКМ.

Таблица 2. Данные экспрессии маркеров стволовых клеток СКМ по четырем клонам

Экспрессия маркеров МСК Маркер: Ме (мин – макс)	Экспрессия маркеров гемопозитических стволовых клеток Маркер: Ме (мин – макс)	Экспрессия маркеров других тканеспецифичных стволовых клеток Маркер: Ме (мин – макс)
CD73: 79,8% (67,5% – 99,2%)	CD34: <1,0%	CD29: >99,0%
CD90: 56,6% (10,2% – 99,6%)	CD45: <2,0%	CD44: >99,0%
CD105: 40,7% (25,7% – 74,2%)		CD54: 97,7% (95,5% – 99,0%)
		SSEA4: >99,0%

Для установления отношения СКМ к эпителию канальцевой системы почек была проведена проточная цитометрия с использованием антител к специфическим поверхностным маркерам прогениторных клеток проксимальных канальцев и париетальных клеток капсулы Шумлянско-Боумана. В качестве маркеров были взяты CD133 и CD24 – маркеры прогениторных клеток эпителия проксимальных канальцев и капсулы Шумлянско-Боумана, CD106 – маркер клеток капсулы Шумлянско-Боумана и подокаликсин (PDX) – маркер подоцитов. В качестве отрицательного контроля были использованы антитела против CD31. Данные проточной цитометрии по клонам представлены в таблице 3.

У 2 из 13 клонов отсутствовала экспрессия маркера эпителия капсулы Шумлянско-Боумана CD106. Одновременно с этим у этих CD106- клонов СКМ наблюдалась высокая экспрессия маркеров прогениторных клеток CD24 и CD133, а также отсутствовала экспрессия PDX. Таким образом, 2 из 13 клонов обладали фенотипом CD24+CD133+CD106-PDX-. Данный фенотип соответствует прогениторным клеткам проксимальных канальцев.

У 4 из 11 CD106+ клонов СКМ наблюдалась высокая (>30%) или умеренная (10-30%) экспрессия маркера прогениторных клеток CD133, а также высокая экспрессия другого маркера прогениторных клеток CD24 и отсутствие экспрессии маркера подоцитов PDX. Данные клоны СКМ имели фенотип CD24+CD133+/±CD106+PDX-, соответствующий париетальным клеткам мочевого полюса капсулы Шумлянско-Боумана.

У двух клонов наблюдалась положительная экспрессия маркера клеток капсулы Шумлянско-Боумана CD106 и маркера прогениторных клеток CD24, но отрицательная экспрессия CD133 и PDX. Таким образом, фенотип двух клонов соответствовал CD24+CD133-CD106+PDX-.

У оставшихся 5 из 11 CD106+ клонов СКМ наблюдалась положительная экспрессия PDX. У всех PDX+ клонов отсутствовала экспрессия CD133 и в одном из 5 случаев наблюдалась низкая экспрессия другого маркера прогениторных клеток CD24. Таким образом, у 5 из 13 клонов выделенных СКМ фенотип, CD24-/±/+CD133-CD106+PDX+, соответствовал париетальным клеткам сосудистого полюса капсулы Шумлянско-Боумана, которые являются непосредственными предшественниками подоцитов.

Таким образом, в настоящем исследовании показано наличие нескольких типов прогениторных клеток, описанных для канальцевой системы почек: мультипотентные стволовые клетки париетального эпителия капсулы Шумлянско-Боумана, прогениторные клетки эпителия проксимальных канальцев и коммитированные предшественники подоцитов с фенотипом CD24-CD133-CD106+PDX+.

Для определения характеризующих признаков клеток переходного эпителия и ГМК мочевого пузыря было проведено иммуноцитохимическое окрашивание ГМК и клеток переходного эпителия в культуре на различные внутриклеточные маркеры. Иммуноцитохимическое окрашивание показало высокую экспрессию в культуре ГМК αSMA, кальпонины и десмина и умеренную экспрессию тяжелой цепи миозина (рисунок 2). В культуре ГМК отсутствовала экспрессия смугелина (рисунок 2B). Результаты иммуноцитохимического окрашивания культуры клеток переходного эпителия показали наличие высокого уровня экспрессии цитокератинов в клетках переходного эпителия (3A). В частности, в клетках переходного эпителия обнаружено высокое содержание СК 7 и 13, в то время как СК 20 не экспрессируется в клетках переходного эпителия в культуре (рисунок 3Г). Также в клетках переходного эпителия в культуре отсутствует экспрессия уроплакина III (рисунок 3Д).

Таблица 3. Экспрессия клонами СКМ поверхностных маркеров стволовых клеток эпителия проксимальных канальцев почки и париетального эпителия капсулы Шумлянско-Боумана.

Клон	Экспрессия поверхностных маркеров	Фенотип (- – <10%, ± – 10-30%, + – >30%)
Клоны СКМ с фенотипом прогениторных клеток проксимальных канальцев		
Клон I312-1912-C2	CD24 – 99.9%, CD133 – 54.2%, CD106 – 0.9%, PDX – 2.4%	CD24+CD133+CD106-PDX-
Клон I312-1912-C5	CD24 – 99.9%, CD133 – 43.4%, CD106 – 0.3%, PDX – 0.2%	CD24+CD133+CD106-PDX-
Клоны СКМ с фенотипом париетальных клеток капсулы Шумлянско-Боумана		
Клон I312-1912-A2	CD24 – 84.0%, CD133 – 96.6%, CD106 – 60.6%, PDX – 1.8%	CD24+CD133+CD106+PDX-
Клон I312-1912-D2	CD24 – 93.1%, CD133 – 25.6%, CD106 – 69.5%, PDX – 0.8%	CD24+CD133±CD106+PDX-
Клон I312-1912-D5	CD24 – 72.1%, CD133 – 21.1%, CD106 – 24.3%, PDX – 0.7%	CD24+CD133±CD106±PDX-
Клон I312-1912-A1	CD24 – 78.0%, CD133 – 18.1%, CD106 – 72.8%, PDX – 0.9%	CD24+CD133±CD106+PDX-
Клон I312-1912-C1	CD24 – 99.6%, CD133 – 1.2%, CD106 – 82.0%, PDX – 5.5%	CD24+CD133-CD106+PDX-
Клон I312-1912-A6	CD24 – 47.7%, CD133 – 0.9%, CD106 – 34.4%, PDX – 0.2%	CD24+CD133-CD106+PDX-
Клоны СКМ с фенотипом предшественников подоцитов		
Клон I312-1912-B3	CD24 – 29.8%, CD133 – 9.3%, CD106 – 82.0%, PDX – 53.9%	CD24±CD133-CD106+PDX+
Клон I312-1912-D1	CD24 – 8.3%, CD133 – 7.4%, CD106 – 68.5%, PDX – 71.2%	CD24-CD133-CD106+PDX+
Клон I312-1912-A3	CD24 – 99.8%, CD133 – 5.4%, CD106 – 31.5%, PDX – 16.7%	CD24+CD133-CD106+PDX±
Клон I312-1912-B6	CD24 – 99.2%, CD133 – 1.5%, CD106 – 44.5%, PDX – 65.5%	CD24+CD133-CD106+PDX+
Клон I312-1912-C6	CD24 – 99.8%, CD133 – 0.9%, CD106 – 22.1%, PDX – 45.6%	CD24+CD133-CD106±PDX+

Дифференцировка СКМ в ГМК производилась содержанием СКМ на протяжении 10 дней в среде, содержащей факторы роста PDGF-BB (5 нг/мл) и TGF-β1 (2,5 нг/мл). Оценка эффективности дифференцировки проводилась с помощью иммуноцитохимического окрашивания культур клонов СКМ на маркеры ГМК до дифференцировки и после. В качестве положительного контроля была взята культура ГМК.

До дифференцировки культуры СКМ экспрессировали маркеры ГМК, однако экспрессия была значительно меньше, чем для культуры ГМК: экспрессия αSMA была на уровне 46,8% [27,7% – 65,9%] относительно культуры ГМК, экспрессия кальпонины на уровне 37,6% [21,2% – 55,4%] относительно культуры ГМК. Также иммуноцитохимическое окрашивание показало отдельные внутриклеточные островки десмина в культуре СКМ до дифференцировки (рисунок 4). После 10 дней в среде с факторами PDGF-BB и TGF-β1 экспрессия маркеров ГМК в СКМ значительно увеличилась и составила 79,0% [57,0% – 86,7%] относительно культуры ГМК для αSMA и 66,8% [51,8% – 131,1%] относительно культуры ГМК для кальпонины. Относительное изменение экспрессии маркеров ГМК в клонках СКМ изменилось на 79,6% [21,3% – 119,2%] ($p=0,0115$) для αSMA и на 97,6% [-6,4% – 248,8%] ($p=0,0379$) для кальпонины (таблица 3). Следует отметить, что не было отмечено изменений в паттерне экспрессии десмина внутри клеток СКМ по окончании периода дифференцировки (рисунок 4Д).

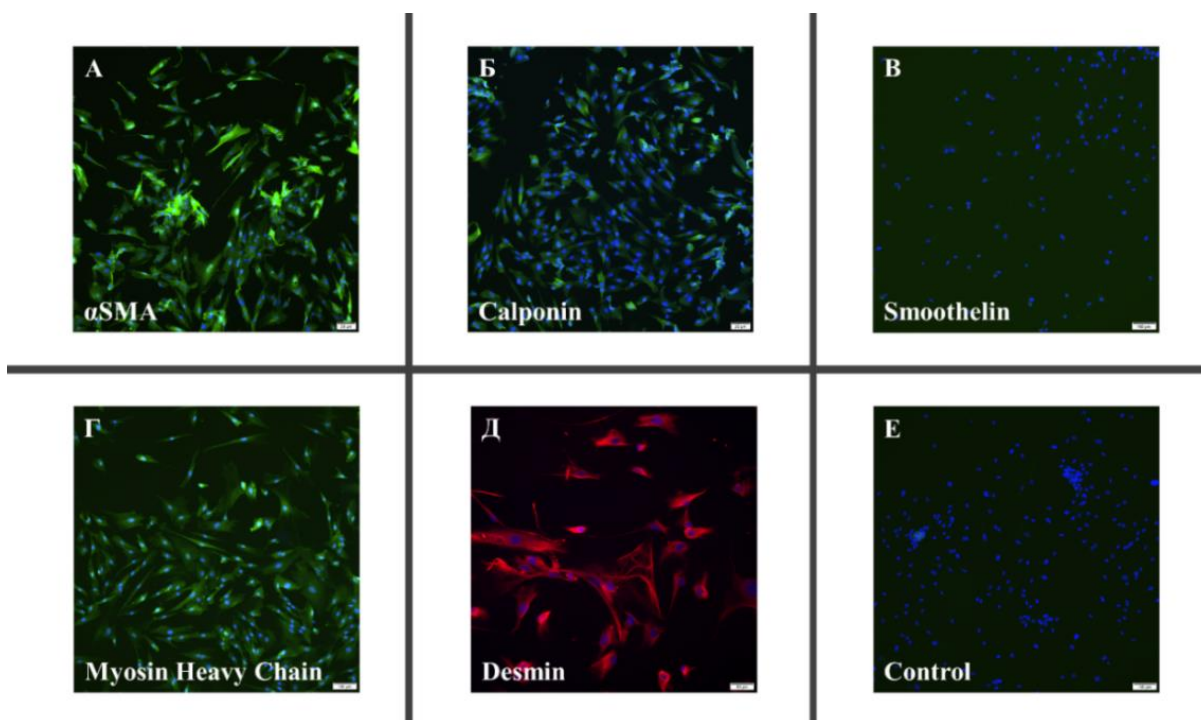


Рисунок 2. Экспрессия филаментов ГМК в культуре (флуоресцентная микроскопия). А: экспрессия α SMA; Б: экспрессия кальпонины; В: экспрессия смузелина; Г: экспрессия тяжелой цепи миозина; Д: экспрессия десмина; Е: отрицательный контроль – покраска клеток без первичных антител. Синий – DAPI.

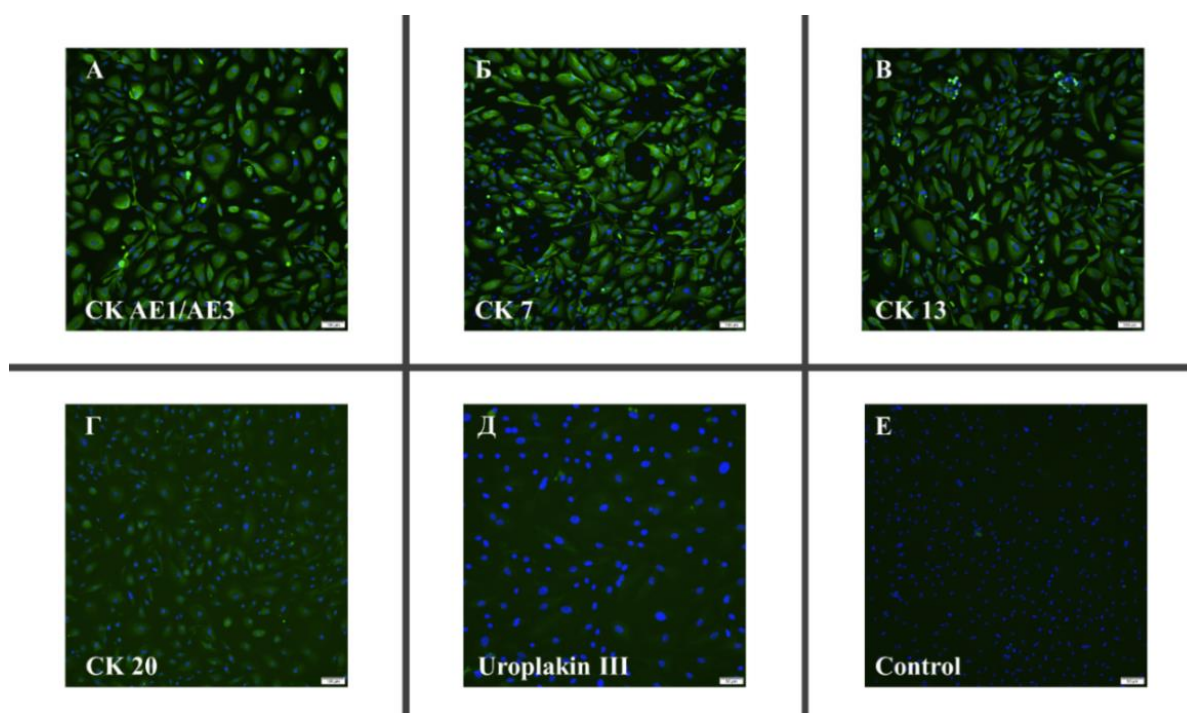


Рисунок 3. Экспрессия цитокератинов и уроплакина клетками переходного эпителия в культуре (флуоресцентная микроскопия). А: экспрессия СК AE1/AE3; Б: экспрессия СК 7; В: экспрессия СК 13; Г: экспрессия СК 20; Д: экспрессия уроплакина III; Е: отрицательный контроль – покраска клеток без первичных антител. Синий – DAPI.

Дифференцировка СКМ в клетки переходного эпителия производилась содержанием СКМ на протяжении 10 дней в среде, содержащей высокую концентрацию фактора роста EGF (30 нг/мл). В качестве маркеров дифференцировки были взяты жесткие промежуточные филаменты цитоскелета клеток переходного эпителия СК AE1/AE3, СК 7 и СК13. В качестве положительного контроля экспрессии была использована культура клеток переходного эпителия.

Несмотря на положительную экспрессию цитокератинов клонами СКМ до дифференцировки, уровень экспрессии был значительно меньше в сравнении с клетками переходного эпителия, составляя лишь 10,4% [7,1% – 13,7%] относительно клеток положительного контроля. Анализ по отдельным видам цитокератинов показал, что уровень экспрессии СК 7 в клетках СКМ до дифференцировки составлял 8,0% [6,0% – 26,7%] относительно положительного контроля. Также в клонах СКМ отсутствовала экспрессия СК13 – 0,7% [0,4% – 1,5%] относительно положительного контроля (рисунок 5). После содержания клонов СКМ в среде с высокой концентрацией EGF на протяжении 10 дней не наблюдалось заметного изменения в уровне экспрессии цитокератинов. Так к концу дифференцировки экспрессия СК AE1/AE3 составила 11,0% [8,1% – 22,8%] относительно положительного контроля, а экспрессия СК 7 – 8,6% [4,3% – 33,3%]. Относительное изменение экспрессии цитокератинов в клетках СКМ составило 24,9% [-14,6% – 66,7%] ($p=0,2598$) для СК AE1/AE3 и 7,6% [-28,9% – 24,6%] ($p=0,9512$) для СК 7 (таблица 3). Следует отметить, что к концу периода дифференцировки не было отмечено изменения в уровне экспрессии СК 13, интенсивность флюоресценции для которого, как и до дифференцировки, не отличалась от отрицательного контроля.

Оценка жизнеспособности СКМ после культивирования на биоматериале с применением реагента PrestoBlue на 5 и 10 дни культивирования показала, что клетки сохраняют жизнеспособность и пролиферируют на биоматериале ССС (рисунок 6). Хотя все клоны СКМ показали положительную динамику роста культуры со временем, скорость пролиферации на биоматериале значительно отличалась между клонами. Так на 5 сутки культивирования на биоматериале ССС медиана доли клеток от монослоя составила 35,0% при минимальном и максимальном значениях 25,1% и 64,8%, соответственно. К 10 суткам медиана доли клеток от монослоя на биоматериале составила 48,5% при минимальном и максимальном значениях 47,1% и 82,6%, соответственно.

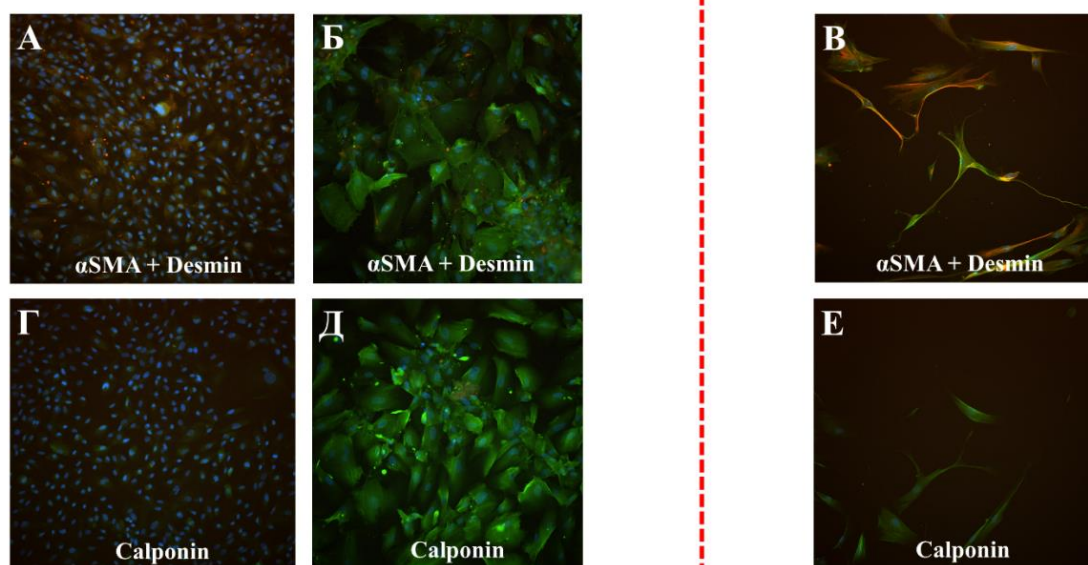


Рисунок 4. А: экспрессия α SMA (зеленый) и десмина (красный) в СКМ до дифференцировки; Г: экспрессия кальпонины в СКМ до дифференцировки; Б: экспрессия α SMA (зеленый) и десмина (красный) в СКМ после дифференцировки в ГМК (флуоресцентная микроскопия, синий - DAPI); Д: экспрессия кальпонины в СКМ после дифференцировки; В: экспрессия α SMA (зеленый) и десмина (красный) в ГМК в культуре; Е: экспрессия кальпонины в ГМК в культуре. Флуоресцентная микроскопия, синий - DAPI.

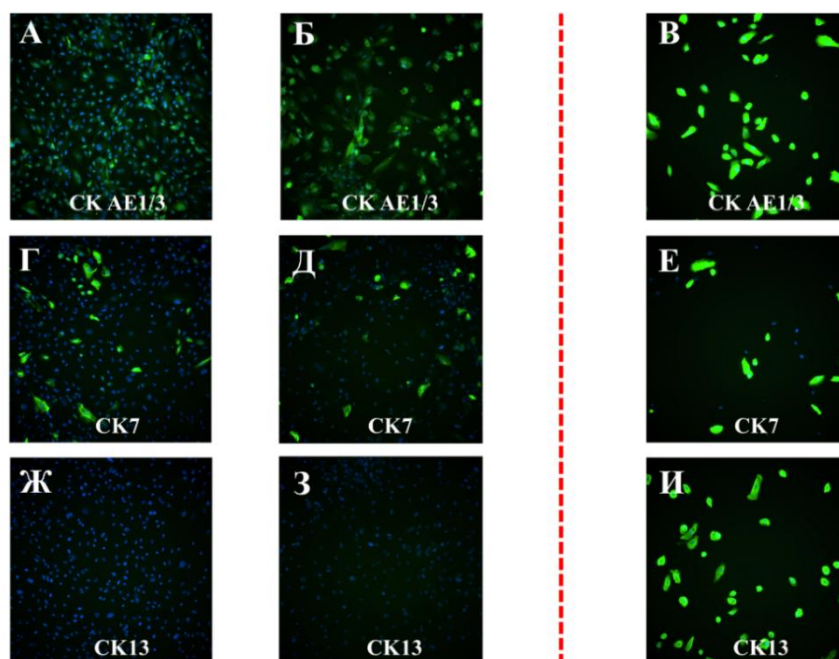


Рисунок 5. А, Г, Ж: экспрессия цитокератинов в СКМ до дифференцировки; Б, Д, З: экспрессия цитокератинов в СКМ после дифференцировки в клетки переходного эпителия; В, Е, И: экспрессия цитокератинов клетками переходного эпителия в культуре. Флуоресцентная микроскопия, синий – DAPI.

Таблица 4. Относительные значения экспрессии маркеров до и после дифференцировки

Маркер дифференцировки	Относительный уровень экспрессии маркеров		Относительное изменение экспрессии маркера после дифференцировки Ме [мин.–макс.]*
	До дифференцировки Ме [мин.–макс.]	После дифференцировки Ме [мин.–макс.]	
Маркеры ГМК			
α-SMA	46,8% [27,7% – 65,9%]	79,0% [57,0% – 86,7%]	79,6% [21,3% – 119,2%] p=0,0115
Кальпонин	37,6% [21,2% – 55,4%]	66,8% [51,8% – 131,1%]	97,6% [-6,4% – 248,8%] p=0,0379
Маркеры клеток переходного эпителия			
СК AE1/AE3	10,4% [7,1% – 13,7%]	11,0% [8,1% – 22,8%]	24,9% [-14,6% – 66,7%] p=0,2598
СК 7	8,0% [6,0% – 26,7%]	8,6% [4,3% – 33,3%]	7,6% [-28,9% – 24,6%] p=0,9512
СК 13	0,7% [0,4% – 1,5%]	0,7% [-0,6% – 3,2%]	-

Примечание. * — для СК 13 относительное значение экспрессии до и после дифференцировки для стволовых клеток из мочи было на уровне отрицательного контроля, поэтому относительное изменение экспрессии не подсчитано.

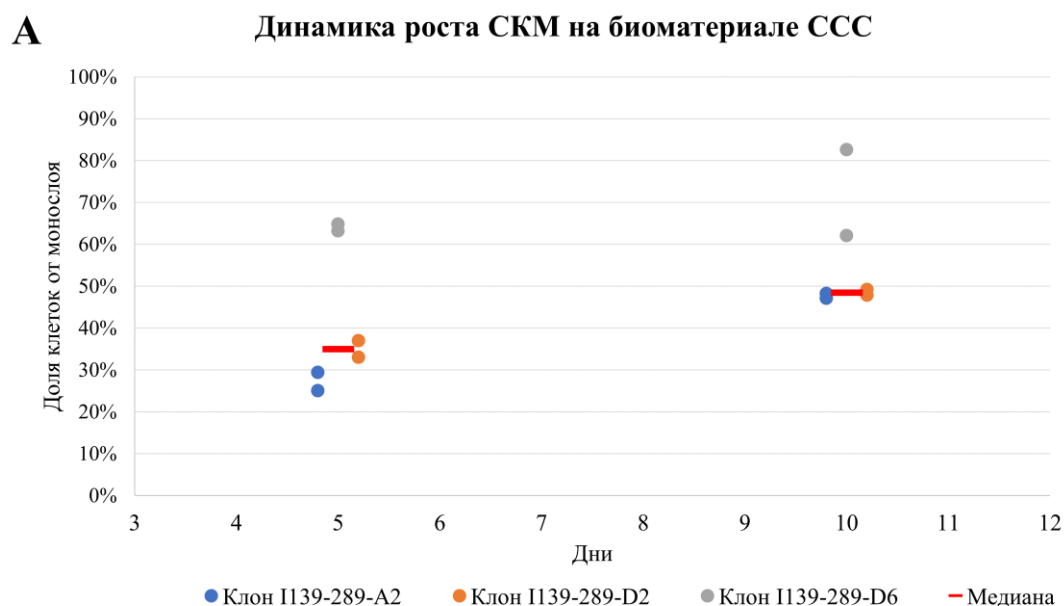


Рисунок 6. Жизнеспособность 3 клонов СКМ на биоматериале ССС, определенная методом оценки метаболической активности клеток с применением реагента PrestoBlue.

ВЫВОДЫ

1. Стволовые клетки, выделенные из мочи, — клетки, встречающиеся в крайне малых количествах в моче, способны к образованию культур *in vitro*, экспрессируют на своей поверхности маркеры мезенхимальных стромальных клеток и других видов стволовых клеток: CD73, CD90, CD105, CD29, CD44, CD54; не экспрессируют маркеры гематопоэтических стволовых клеток; имеют эпителиальный фенотип.
2. Стволовые клетки, выделенные из мочи, представляют собой гетерогенную популяцию клеток, содержащую субпопуляцию клеток с фенотипом прогениторных клеток проксимальных канальцев нефрона, субпопуляцию клеток с фенотипом стволовых клеток париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана и субпопуляцию клеток с фенотипом предшественников подоцитов.
3. Гладкомышечные клетки мочевого пузыря в культуре имеют высокую экспрессию внутриклеточных маркеров α SMA, кальпонина и десмина и умеренную экспрессию тяжелой цепи миозина. Клетки уротелия мочевого пузыря, имеют высокий уровень экспрессии внутриклеточных цитокератинов AE1/AE3, 7 и 13.
4. Содержание стволовых клеток, выделенных из мочи, в среде с факторами тромбоцитарного фактора роста-BB и трансформирующего фактора роста- β 1 приводит к значительному увеличению экспрессии факторов гладкомышечных клеток α SMA и кальпонина. Содержание стволовых клеток, выделенных из мочи, в среде с высоким содержанием эпидермального фактора роста не приводит к достоверному изменению в экспрессии маркеров уротелия цитокератинов AE1/AE3, 7 и 13.
5. Стволовые клетки, выделенные из мочи, выживают и пролиферируют на биоматериале на основе коллагена первого типа.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ РАБОТ

1. **Васютин И.А.**, Люндуп А.В., Кузнецов С.Л. Моча как источник стволовых клеток для регенеративной медицины мочевыводящих путей. / II Национальный конгресс по регенеративной медицине; Декабрь 3–5, 2015; Москва. — С. 41.
2. Реконструкция уретры с помощью технологии тканевой инженерии, **Васютин И.В.**, Люндуп А.В., Винаров А.З. и др. **Вестник РАМН**, 72(1), 2017, стр. 17–25.
3. Grechenkov A, Sukhanov R, Bezrukov E, Butnaru D, Barbagli G, **Vasyutin I**, Tivtikyan A, Rapoport L, Alyaev Y, Glybochko P. Risk factors for urethral stricture and/or bladder neck contracture after monopolar transurethral resection of the prostate for benign prostatic hyperplasia. **Urologia**. 2018 Nov;85(4):150-157.
4. **Vasyutin I**, Zerihun L, Ivan C, Atala A. Bladder Organoids and Spheroids: Potential Tools for Normal and Diseased Tissue Modelling. **Anticancer Res**. 2019 Mar;39(3):1105-1118.
5. **Васютин И.А.**, Кузнецов С.Л., Люндуп А.В. Стволовые клетки, выделенные из мочи: оценка потенциала дифференцировки в гладкомышечные клетки и клетки переходного эпителия. **Вестник РАМН**, 74(3), 2019, стр. 176-184.
6. **Vasyutin I**, Butnaru D, Lyundup A, Timashev PS, Vinarov A, Kuznetsov S, Atala A and Zhang YY. Frontiers in urethra regeneration: current state and future perspective. **Biomed Mater**. 2020 Jun 5

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ:

ГМК – гладкомышечные клетки

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

СКМ – стволовые клетки, выделенные из мочи

СО – стандартное отклонение

α SMA – α гладкомышечный актин

ССС – биоматериал на основе коллагена первого типа (collagen cell carrier)

СК – цитокератин

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DMEM – модифицированная Дульбекко среда Игла (Dulbecco's modified Eagle medium)

EGF – эпидермальный фактор роста

FBS – фетальная телячья сыворотка (fetal bovine serum)

KSFM – бессывороточная среда для кератиноцитов (keratinocyte serum-free medium)

PDGF-BB – тромбоцитарный фактор роста BB (platelet-derived growth factor-BB)

PDX – подокаликсин

TGF β – трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor β)