

2. Chen B. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549 //Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2011. – Т.29.– №1. – Р. 1.

3. Chen B. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549 / B. Chen, X. Wang, W. Zhao, J. Wu // J ExpClin Cancer Res. – 2009. – №19. – Р 29-39.

4. Gomis R.R. C/EBP $\beta$  at the core of the TGF $\beta$  cytosstatic response and itsevasion in metastatic breast cancer cells // Cancer cell. – 2005. – Vol.10. – №.3. – Р. 203-214.

УДК 577.17.05

**Яковлева Е.А., Сичкар Д.А., Makeev O.G.  
ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК IN VITRO КАК ЭТАП  
РАЗРАБОТКИ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ  
НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

Кафедра медицинской биологии и генетики  
Уральский государственный медицинский университет  
Лаборатория технологий генной и клеточной терапии  
Институт медицинских клеточных технологий  
Екатеринбург, Российская Федерация

**Yakovleva E.A., Sichkar D.A., Makeev O.G.  
TRANSDIFFERENTIATION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL  
STROMAL CELLS IN VITRO AS A STAGE OF DEVELOPMENT OF GENE-  
CELLULAR TREATMENT OF HEPATIC INSUFFICIENCY**

Department of medical biology and genetics  
Laboratory of gen- technology and cellular therapy  
Institute of medical cell technologies  
Ural state medical university  
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: larim@mail.ru

**Аннотация.** Представлены результаты исследований, проведенных на культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Осуществлена трансфекция ММСК плазмидным вектором с геном HGF (фактора роста гепатоцитов) и показана возможность их трансдифференцировки в гепатоцитоподобные клетки. Полученные результаты позволяют проводить дальнейшие исследования по разработке технологии генно-клеточной терапии недостаточности функции печени.

**Annotation.** The results of studies conducted on cultures of multipotent mesenchymal stromal cells are presented. The MMSC was transfected with a plasmid vector with the gene HGF (hepatocyte growth factor) and the possibility of their transdifferentiation into hepatocyte-like cells was shown. The results obtained allow further research to develop the technology of gene-cell therapy of liver failure.

**Ключевые слова:** мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка, плазмидный вектор, ген фактора роста гепатоцитов, трансдифференцировка

**Key words:** multipotent mesenchymal stromal cell, plasmid vector, hepatocyte growth factor gene, transdifferentiation

### **Введение**

Недостаточность функций печени является патологией, для терапии которой пересадка органа остается практически безальтернативным методом. Несмотря на очевидные успехи трансплантологии, эффективность пересадки печени остается невысокой [1]. В связи с этим, развитие новых методов направлено на снижение числа пациентов, которым показана трансплантация органа. Так, открытие факторов регенерации печени позволило применить их рекомбинантные аналоги с целью терапии печеночной недостаточности. Однако короткое время жизни данных пептидов делает необходимым их постоянное продолжительное введение, а широкий спектр их действия сужает возможности клинического применения [2,3,4]. Известны успешные попытки применения генных технологий для внесения генов, кодирующих данные белки, в клетки печени. Между тем эффективность и селективность трансфекции *in vivo* крайне незначительна. Векторы на основе вирусов показывают лучшие результаты, но они интегрируются в геном, что делает невозможным их клиническое применение [5].

С другой стороны, известны попытки введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Однако несколько независимых исследовательских групп продемонстрировали, что только весьма незначительная часть введенных ММСК дифференцируется в гепатоциты (<0.01%) [5,6,7,8,9,10], а механизм стимуляции регенерации печени и механизм хоуминга ММСК в пораженную печень остается во многом неясным [11].

Учитывая вышеизложенное, наиболее перспективным решением представляется разработка методов генно – клеточной терапии, одним из вариантов которой является создание гепатоцитоподобных клеток из ММСК человека *in vitro* с последующим введением пациенту.

**Цель исследования** – получить гепатоцитоподобные клетки путем трансфекции ММСК плазмидным вектором с геном HGF (фактора роста гепатоцитов) и подтвердить направленность их трансдифференцировки.

### **Материалы и методы исследования**

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки получали из липоаспирата от шести клинически здоровых женщин в возрасте 34-41 год с их информированного согласия, культивировали в среде DMEM/HamF-12

(SigmaAldrich, США), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки (SigmaAldrich, США).

Исследования проводили в опытной и контрольной группах. Опытную группу трансфецировали плазмидой, несущей ген фактора роста гепатоцитов, контрольная группа оставалась без генетической коррекции. Плазмиду, с помощью набора (ZymoResearch, D4015) выделяли из культуры *E. coli*, предоставленной лабораторией доктора Hal Dietz Университета Джона Хопкинса (США) в рамках договора о межвузовском сотрудничестве. Для трансфекции использован комплекс поликатионных липидов Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) согласно протокола производителя. Смену среды проводили каждые 3 дня. Заменяемую среду собирали и хранили при - 20°C для последующего определения альфафетопротеина и мочевины.

Спустя 21 сутки после трансфекции, клетки снимали с использованием раствора трипсина (Sigma Aldrich) и пересевали на 6-ти луночные планшеты из расчета  $1 \cdot 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>. Через сутки клетки промывали раствором PBS (Sigma Aldrich) и в течение 1 минуты фиксировали смесью формалин/метанол, после чего клетки обрабатывали раствором йодной кислоты в течении 1 минуты, а затем окрашивали реактивом Шиффа (Sigma Aldrich) и смесью гематоксилин-эозина в течении 4-5 минут. PAS окрашивание проводили по стандартной методике [12]. Морфологические признаки клеток оценивали методами фазово-контрастной и световой микроскопии.

Концентрацию мочевины определяли колориметрическим методом с использованием наборов и стандартов фирмы Sigma Aldrich в среде культивирования трансфецированных и контрольных ММСК (OD 260)

Определение альфафетопротеина в культуральных средах выполняли при помощи наборов фирмы Abbot на анализаторе AxSym.

Все полученные данные подвергались статистической обработке на программе RStudio (Version 0.99.491 – RStudio, Inc.).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

По данным микроскопии, изменение морфологии ММСК опытной группы наблюдалось уже на третий день культивирования – клетки уменьшались в размерах, приближаясь к округлой форме, их отростки укорачивались. На 21-й день культивирования большинство клеток приобретало полигональную форму с центрально расположенным ядром.

Спустя 6 недель после трансфекции в опытной группе обнаруживались морфологически определяемые колонии гепатоцитоподобных клеток полигональной формы с одним или несколькими округлыми ядрами. Положительные результаты в реакции определения депонирования гликогена также позволяют судить о приобретении этими клетками фенотипа гепатоцитов (Рис. 1).

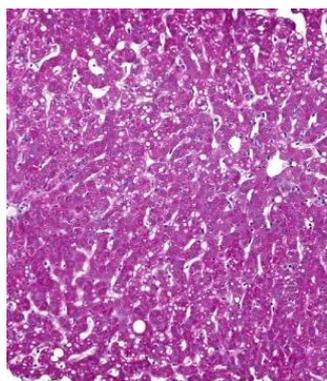


Рис. 1 – Морфология культивируемых тММСК через 42 дня после трансфекции плазмидным вектором с геном HGF. Окраска по Шиффу + гематоксилин/эозин, светлое поле, х40

По данным анализа культуральной среды, в период с 6 по 21 сутки трансфицированные ММСК, в отличие от интактных, продемонстрировали способность продуцировать альфафетопротейн и мочевины (таблица 1), причем в процессе трансдифференцировки тММСК наблюдалось снижение продукции альфафетопротейна, основного маркера незрелых гепатоцитов, с повышением количественного уровня мочевины.

Данное наблюдение укладывается в подтверждение выдвинутого предположения о трансдифференцировке трансфицированных ММСК в гепатоцитоподобные клетки и их постепенное созревание.

Таблица 1.

Динамика синтеза трансфицированными ММСК мочевины и альфафетопротейна

Показатель	Сутки после трансфекции		
	6	12	21
Мочевина, пг/клетку/час	5,23± 0,12	20,01±0 ,24	25,57±0 ,42
Альфа- фетопротейн пг/10 <sup>6</sup> клеток/час	13,62± 0,51	12,56±0 ,19	10,14±0 ,28

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены клетки, обладающие морфо-функциональными признаками гепатоцитов.

#### **Выводы:**

1. В результате трансфекции ММСК плазмидным вектором, содержащим ген фактора роста гепатоцитов, получена культура клеток, для которых характерны морфо-функциональные признаки гепатоцитов.

2. Успешная трансдифференцировка ММСК в гепатоцитоподобные клетки обеспечивает дальнейшие исследования в области разработки технологии генно-клеточной терапии недостаточности функции печени.

**Список литературы:**

1. Lee W.M., Squires R.H., Nyberg S.L., Doo E., Hoofnagle J.H. Acute liver failure - summary of a workshop. //Hepatology. 2008- Vol. 47 - P. 1401–1415.
2. Enns G.M., Millan M.T. Cell-based therapies for metabolic liver disease. //Mol. Genet. Metab. 2008. - Vol. 95. - P. 3–10.
3. Lysy P.A., Campard D., Smets F., Najimi M., Sokal E.M. Stem cells for liver tissue repair - p. current knowledge and perspectives. //World J. Gastroenterol. 2008- Vol. 14 - P. 864–875.
4. Morizono K., De Ugarte D.A., Zhu M. et al. Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. //Hum. Gene Ther. 2003- Vol. 14(1) - P. 59-66.
5. Alvarez-Dolado M., Pardal R. Garcia-Verdugo J.M., et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes.// Nature. 2003- Vol. 425 - P. 968–973.
6. Cantz T., et al. Reevaluation of bonemarrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. //Cell Transplant. 2004. - Vol. 13. - P. 659–666.
7. Alvarez-Dolado M., Pardal R. Garcia-Verdugo J.M., et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes.// Nature. 2003.- Vol. 425. - P. 968–973.
8. Cantz T., et al. Reevaluation of bonemarrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. //Cell Transplant. 2004. - Vol. 13. - P. 659–666.
9. Vassilopoulos G., Wang P.R., Russell D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. //Nature. 2003.- Vol. 422 - P. 901–904.
10. Wagner W., Wein F., Seckinger A. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. //Exp. Hematol. 2005.- Vol. 33.- P. 1402–1416.
11. Wang X. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. //Nature .2003- Vol. 422 - P. 897–901.
12. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. //J. Clin. Invest. 2002. – Vol. 109. - P. 1291 – 302.