

Кулинич С.С.¹ ✉, Зафранская М.М.¹, Гаин Ю.М.²

Влияние трансформирующего фактора роста-β1 на активацию миогенного потенциала и антипролиферативные свойства мезенхимальных стромальных клеток *in vitro*

¹ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины, Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

✉ bagatka_sv@mail.ru

Аннотация. В настоящей работе проведено исследование влияния трансформирующего фактора роста-β1 в среде культивирования на активацию миогенных путей дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток, экспрессию генов миоспецифических маркеров и антипролиферативные свойства клеток.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; миогенная дифференцировка; трансформирующий фактор роста-β1; антипролиферативные свойства.

Kulinich S.¹, Zafranskaya M.¹, Gain Yu.²

Influence of transforming growth factor-β1 on myogenic potential activation and antiproliferative properties of mesenchymal stromal cells *in vitro*

¹ Scientific Research Institute of Experimental and Clinical medicine, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. In this work we studied effect of transforming growth factor-β1 in the culture medium on activation of mesenchymal stromal cells myogenic differentiation pathways, myospecific marker genes expression and antiproliferative properties of cells.

Keywords: mesenchymal stromal cells; myogenic differentiation; transforming growth factor-β1; antiproliferative properties.

Получение культуры лейомиоцитов с целью применения в регенеративной медицине сопряжено с высокой инвазивностью процедуры забора гладкомышечной ткани, а также проблемой снижения сократительной активности клеток при экспансии *in vitro* по причине активации их перехода к секреторному фенотипу. В связи с этим актуален поиск более доступных альтернативных источников клеток, способных дифференцироваться в миогенном направлении и приобретать функциональную активность миоцитов гладких мышц. Одной из популяций клеток, обладающих миогенным потенциалом, является активно изучаемая популяция мультипотентных мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (ММСК). Большинство исследований, посвященных оценке миогенного потенциала ММСК, направлено на поиск индукторов миогенного пути дифференцировки клеток (трансформирующий фактор роста-β1 (*TGF*-β1), ингибитор МЕК-киназ, гепарин и др.) и доказательство их эффективности посредством определения экспрессии миоспецифических генов-маркеров. При этом остаётся без внимания влияние активаторов миогенной дифференцировки на иммуномодулирующие функции ММСК, играющие важную роль в реализации репаративных возможностей клеток.

Цель исследования: оценить изменение профиля экспрессии миоспецифических генов и антипролиферативные свойства ММСК в условиях стимуляции миогенного потенциала фактором *TGF*-β1.

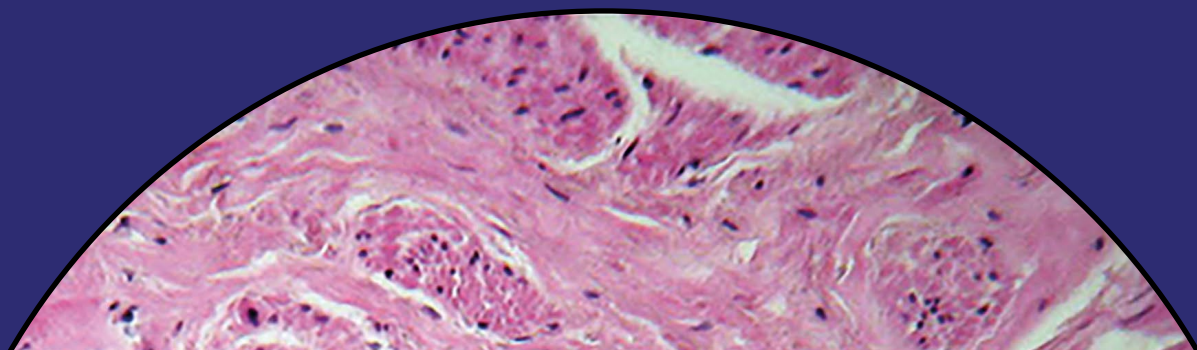
Материалом для исследования являлись культуры ММСК ($n = 12$), полученные путём энзиматического расщепления образцов подкожной жировой ткани здоровых доноров, оперированных по поводу абдоминопластики. Для активации миогенного потенциала клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 5 нг/мл *TGF-β1*, 1% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% антибиотика, 1% L-глутамина в течение 6 дней. Интактные культуры МСК инкубировали в полной питательной среде DMEM с 10% ЭТС, 1% антибиотика и 1% L-глутамина. Жизнеспособность МСК подсчитывали в ходе окрашивания клеточной суспензии 0,4%-ным раствором трипанового синего. Исследование экспрессии генов-маркеров лейомиоцитов (трангелин, кальпонин, миокардин и тяжёлые цепи миозина гладких мышц) в образцах интактных/дифференцированных культур проводили методом обратнo-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени. Для оценки антипролиферативных свойств МСК дифференцированные клетки кокультивировали с окрашенными карбоксифлуоресцеином мононуклеарами периферической крови (МПК) здоровых доноров ($n = 10$) в соотношении 1:10 в полной культуральной среде RPMI (10% ЭТС, 1% антибиотика, 1% L-глутамина), содержащей неспецифический стимулятор пролиферации Т-лимфоцитов — фитогемагглютинин (2,5 мкг/мл). Регистрацию количества пролиферирующих и непролиферирующих Т-лимфоцитов на 6 сутки инкубации осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклонального антитела CD3-PC7 (Beckman Coulter). При статистической обработке данных применяли критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

В ходе микроскопического анализа роста клеточных культур в дифференцировочной среде выявлено преобладание фибробластоподобных клеток над клетками веретеновидной морфологии и увеличение плотности волокон цитоскелета. Жизнеспособность МСК при кокультивировании с *TGF-β1* сохранялась на высоком уровне, статистически значимо не отличаясь от данного показателя в интактных культурах (93 (89÷96)% и 96 (94÷98)%, соответственно).

В интактных МСК установлена конститутивная экспрессия гена гладкомышечного α-актина. Стимуляция миогенных путей дифференцировки в присутствии *TGF-β1* приводила к активации в МСК генов и других специфических маркеров дифференцировки/созревания гладкомышечных клеток: трангелина, тяжёлых цепей миозина гладких мышц, кальпонины и миокардина.

Проведена оценка количества пролиферирующих CD3⁺ Т-клеток в кокультурах МПК с интактными/дифференцированными МСК и в культурах МПК, стимулированных ФГА. В присутствии дифференцированных клеток процент пролиферирующих митоген-стимулированных Т-лимфоцитов статистически значимо повышался по сравнению с показателем в кокультурах МПК с интактными МСК (75 (63÷81)% и 51 (43÷59)%, соответственно, $p < 0,05$), но не достигал значений процента пролиферации лимфоцитов в пробах со стимулированными ФГА МПК (92 (88÷94)%, $p < 0,05$).

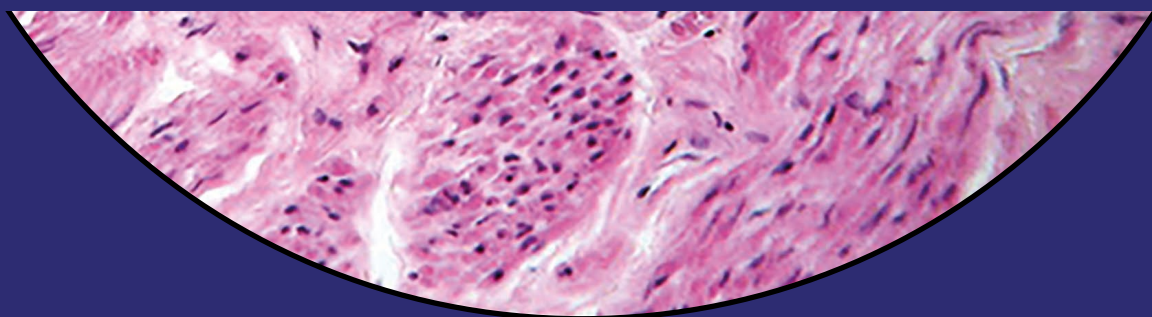
Таким образом, использование *TGF-β1* в качестве индуктора миогенного потенциала МСК позволяет получить жизнеспособную культуру лейомиоцитоподобных клеток, экспрессирующих ряд генов специфических маркеров дифференцировки/созревания гладкомышечных клеток: гладкомышечного α-актина, трангелина, тяжёлых цепей миозина гладких мышц, кальпонины и миокардина. Несмотря на значительное снижение, антипролиферативные свойства МСК в процессе дифференцировки сохраняются, обуславливая способность миостимулированных культур подавлять пролиферацию и активность клеток адаптивного иммунитета при их практическом использовании в регенеративной медицине.



Материалы
VI Национального конгресса по регенеративной медицине
13–15 ноября 2024 года, Санкт-Петербург

под патронажем редколлегии журнала
«Морфология»

Proceedings
of the VI National Congress on Regenerative Medicine
November 13–15, 2024, Saint Petersburg



DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.konf2024>