

Исследование эндогенной секреции сосудистого эндотелиального фактора роста мультипотентными мезенхимными стромальными клетками из зачатков третьих моляров человека

В.В. Соловьева¹, Н.Л. Блатт¹, А.К. Шафигуллина², А.А. Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет

² Казанский государственный медицинский университет

Endogenous secretion of vascular endothelial growth factor by multipotent mesenchymal stromal cells derived from human third molar dental follicles

V.V. Solovyeva¹, N.L. Blatt¹, A.K. Shafigullina², A.A. Rizvanov¹

¹ Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan

² Kazan State Medical University, Kazan

В настоящее время активно ведутся исследования секретомы стволовых клеток человека. В работе показано, что мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, выделенные из зачатков третьих моляров человека (ММСК-ЗТМ), характеризуются высокой продукцией сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) при культивировании *in vitro*. В связи с тем, что VEGF является известным ангиогенным и нейротрофическим фактором, применение ММСК-ЗТМ перспективно для разработки методов клеточной терапии различных дегенеративных заболеваний человека.

Ключевые слова: секретом, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, зачатки третьих моляров человека, сосудистый эндотелиальный фактор роста.

В последние годы проведены обширные исследования по анализу секретомы различных клеточных типов. Термин «секретом» используется для характеристики общего пула белков, секретируемых клеткой, тканью или организмом в данный момент времени и при определенных условиях среды [1]. Также секретом отражает функциональное состояние клетки в заданных условиях среды. Более того, клетки могут активировать секрецию различных белков в зависимости от стимулов и сигналов, которые они получают извне [2]. К настоящему времени есть ряд работ, посвященных исследованию секретомы различных клеточных типов, в том числе стволовых [3–5].

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) играют важную роль в самообновлении и регенерации тканей и органов, они способны к дифференцировке в различных направлениях [6, 7]. ММСК секретируют множество трофических и протекторных факторов, что является основанием для их внедрения в клиническую практику для лечения различных заболеваний человека.

Одним из перспективных источников ММСК являются зачатки и пульпа третьих моляров (зубов мудрости) человека [8, 9]. По своим морфологическим и фенотипическим свойствам клетки из указанных тканевых источников могут быть отнесены к ММСК, поскольку они обладают свойством клоногенности, способны пролиферировать как в условиях *in vitro*,

Human stem cells secretome is currently a very hot area of research. We report that multipotent mesenchymal stromal cells isolated from human third molar dental follicles (MMSC-TMDF), are able to secrete high levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) when cultured *in vitro*. Due to the fact that VEGF is a well known angiogenic and neuroprotective factor, the use of MMSC-TMDF is promising for the development of stem cell therapy of various degenerative human diseases.

Key words: secretome, multipotent stem cells, third molar dental follicles, vascular endothelial growth factor.

так и *in vivo*, а также характеризуются способностью к мультилинейной дифференцировке, в том числе в остеобласты, цементобласты, хондробласты, адипоциты, мышечные и нервные клетки [7, 10–14]. Кроме того, клетки пульпы зуба секретируют нейротрофические факторы и способствуют выживанию чувствительных нейронов *in vitro* и двигательных нейронов *in vivo* [15]. Как полученные из любого другого нового источника, ММСК из зачатков третьих моляров (МСК-ЗТМ) требуют тщательного исследования как с точки зрения генетических и фенотипических особенностей, так и с точки зрения безопасности и эффективности для клеточной терапии.

По данным литературы, одним из наиболее перспективных для клинического применения факторов роста является сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), обладающий ангиогенными, нейротрофическими, нейротрофическими свойствами [16–18]. Фактор поддерживает выживание нейронов, защищает нервную ткань от кислородного голодания при гипоксии, стимулирует пролиферацию нейробластов и рост аксонов, а также поддерживает выживание нейронов *in vitro* и *in vivo* [19]. Популяции клеток, в том числе стволовых, обладающие способностью секретировать высокий уровень VEGF, могут иметь преимущество в качестве клеточного материала в разработке методов лечения пациентов с нейродегенеративными и ишемическими заболеваниями.

e-mail: rizvanov@gmail.com

Цель работы — определение эндогенного уровня экспрессии VEGF *in vitro* ММСК, выделенными из зачатков третьих моляров человека.

Материал и методы

Клеточные культуры. ММСК были выделены из зачатка третьего моляра человека, как описано ранее [9, 20]. По медицинским показаниям «зуб мудрости» удалялся хирургом-стоматологом у пациентов с предварительным получением письменного информированного согласия. В течение 30–40 мин после удаления зуб доставляли в лабораторию в физиологическом растворе с добавлением смеси антибиотиков — пенициллина и стрептомицина. В стерильных условиях ламинарного бокса Herasafe Termo (Германия) (второй уровень защиты) проводили механическое очищение твердых тканей зачатка зуба от фолликулярной капсулы. Обрабатывали зачаток зуба раствором Хэнкса (Gibco, США) с добавлением сме-

си антибиотиков (пенициллина и стрептомицина). Осторожно удаляли неминерализованную межкорневую перегородку зуба с помощью стерильного пинцета. Аккуратно извлекали зачаток пульпы из полости зуба. Тщательно измельчали пульпу на мелкие кусочки (1–2 мм) с помощью хирургических скальпелей со сменными лезвиями. Культивирование выполняли на среде Игла, модифицированной по методу Дульбекко (Sigma, США), к которой были добавлены 10% сыворотки крови плодов коровы (Sigma, США), 2 mM L-глутамин (Sigma, США) и 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Sigma, США) при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ [21]. На 3 сут. проводили смену питательной среды. После 10–15 сут. инкубации было отмечено формирование «плотного» монослоя клеток. Замену питательной среды проводили через 1 сут. Пересев клеток проводили с применением раствора 1x трипсина-ЭДТА (Sigma, США).

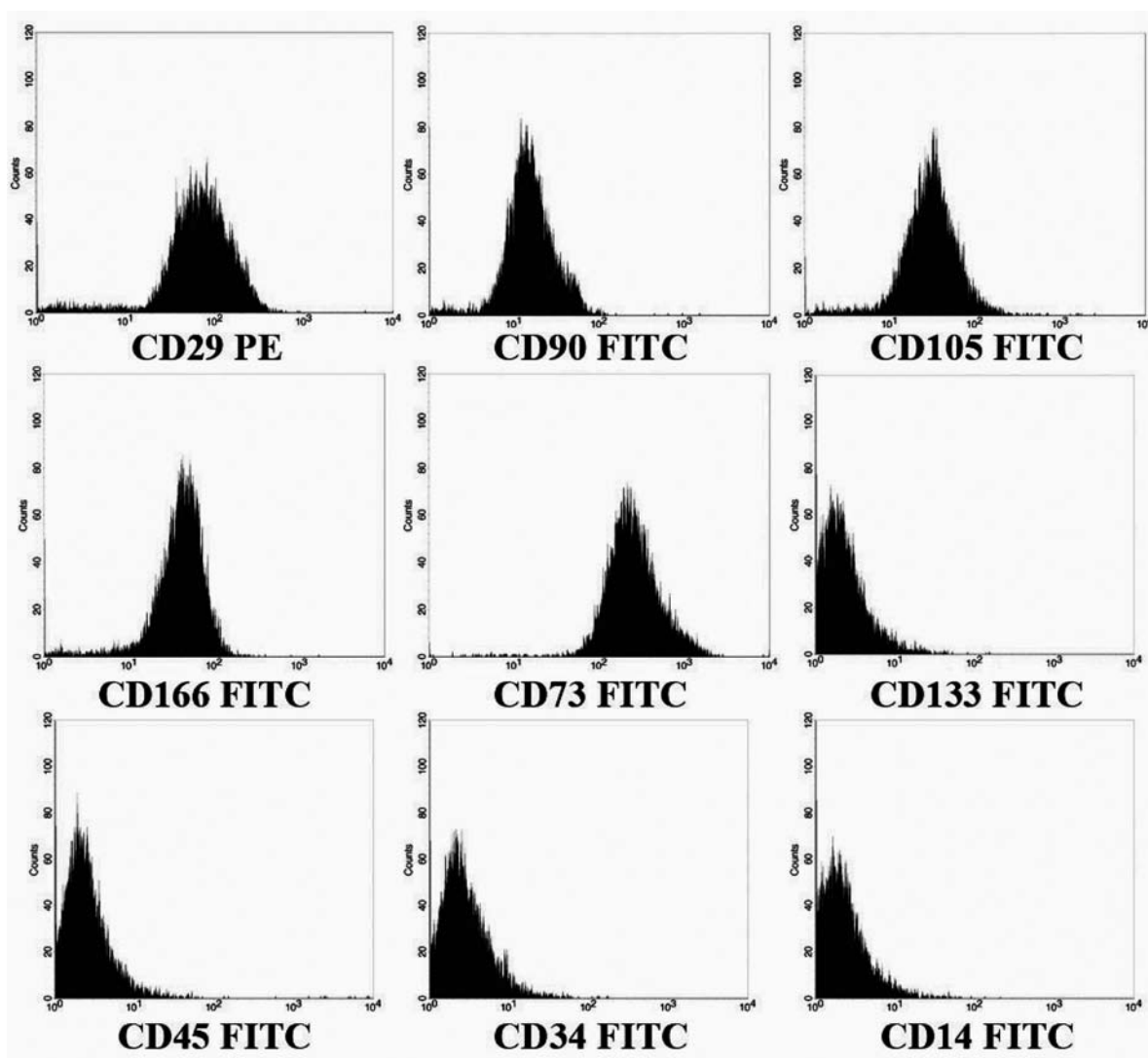


Рис. 1. Экспрессия ММСК третьих моляров человека ряда маркерных молекул. Проточная цитофлуориметрия

Культура эмбриональных клеток почки человека HEK-293T была получена из ATCC (American Type Culture Collection, США) (ATCC номер: CRL-11268).

Иммунофенотипирование ММСК. Экспрессию поверхностных антигенов ММСК оценивали методом проточной цитометрии [22]. Клетки трипсинизировали и инкубировали в фосфатно-солевом буфере в течение 45 мин с первичными антителами к CD14, CD29, CD34, CD45, CD90, CD105, CD133, CD166 (SantaCruz Biotechnology, США) и CD73 (Zymed, США). После того, как клетки отмыли от несвязавшихся антител, все клетки инкубировали со вторичными антителами к иммуноглобулинам кролика или мыши, конъюгированными с FITC (Fluorescein Isothiocyanate, длина волны 488/520) при 4°C в течение 45 мин. CD29-специфичные антитела были PE-мечены (Phycoerythrin, длина волны 488/578) и не требовали инкубации со вторичными антителами. Анализ клеток проводили на проточном цитометре Guava easyCyte 8HT (Millipore, США), согласно инструкциям производителя.

Иммуноферментный анализ экспрессии VEGF в культуре клеток. ММСК и клетки линии HEK-293T культивировали в 12-луночных планшетах. Сбор культуральной среды из лунок с клетками проводили через 1, 3 и 5 сут. Концентрацию VEGF в культуральной среде определяли с помощью набора VEGF-ИФА-БЕСТ А-8784 (Вектор, Россия) по методике, рекомендуемой производителем. Метод определения основан на твердофазном «сэндвич» варианте иммуноферментного анализа (ИФА) с применением моно- и поликлональных антител к VEGF человека. Для построения стандартной кривой использовали калибровочные образцы с известной концентрацией VEGF, входящие в состав набора. Стандартная кривая свидетельствует о чувствительности и линейности детекции измеряемых концентраций VEGF в диапазоне 10–2000 пг/мл. Оптическую плотность растворов измеряли на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite M200Pro (Tecan, Швейцария) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 655 нм. Исходя из прямой пропорциональности между величиной оптической плотности и концентрацией VEGF в стандартных образцах, вычисляли концентрацию VEGF в исследуемых образцах.

В качестве контрольной клеточной линии с низким эндогенным уровнем экспрессии VEGF использовали иммортализованную линию первичных человеческих эмбриональных клеток почки HEK293T.

Результаты и обсуждение

Из зачатков третьих моляров человека были выделены клетки, по своим морфологическим и фенотипическим свойствам аналогичные ММСК, поскольку они обладали фибробласто-подобной морфологией, были способны к длительной пролиферации *in vitro* и обладали способностью к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном, остеогенном и нейрогенном направлениях (информация не показана). С помощью проточной цитофлуориметрии было подтверждено, что выделенные клетки экспрессируют поверхностные антигены CD29, CD73, CD90, CD105 и CD166, характерные для ММСК, но не маркеры гемопоэтических клеток CD14, CD34, CD45 и CD133 (рис. 1).

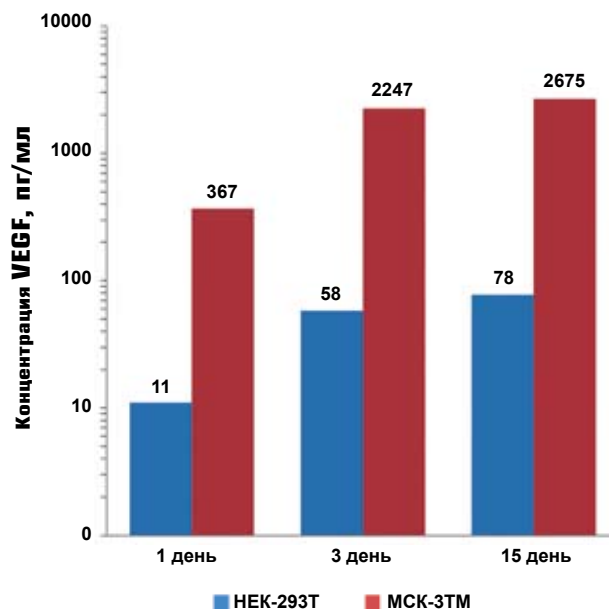


Рис. 2. Эндогенный уровень экспрессии VEGF ММСК, выделенными из зачатков третьих моляров человека. В качестве контрольной клеточной линии с низким эндогенным уровнем экспрессии VEGF использовали культуру клеток HEK-293T

Также в ходе работы было установлено, что ММСК, выделенные из зачатков третьих моляров человека, обладают высокой эндогенной экспрессией гена *vegfr* и активно секретируют белок VEGF в культуральную среду. Концентрация VEGF в культуральной среде на 1 день инкубации составила 367 пг/мл, на 3 день – 2247 пг/мл, на 5 день – 2675 пг/мл. Клетки HEK-293T обладали низким эндогенным уровнем экспрессии VEGF на 1, 3 и 5 день инкубации – 11, 58 и 78 пг/мл, соответственно (рис. 2).

Таким образом, показано, что клетки, выделенные из зачатков третьих моляров человека, соответствуют ММСК и способны секретировать высокие уровни VEGF при культивировании *in vitro*. Так как высокий уровень секреции эндогенного VEGF не требует никакой дополнительной генетической модификации или культивирования при специализированных условиях (например, в присутствии факторов роста или при гипоксии), применение ММСК перспективно для разработки методов клеточной терапии различных дегенеративных заболеваний человека.

Благодарности

Работа частично финансировалась грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований (11-04-00902-а) и ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.А18.21.0113). Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hathout Y. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert. Rev. Proteomics*. 2007; 4(2): 239–48.
2. Chenau J., Michelland S., Seve M. Secretome: definitions and biomedical interest. *Rev. Med. Interne*. 2008; 29(7): 606–8.
3. Estrada R., Li N., Sarojini H. et al. Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J. Cell Physiol*. 2009; 219(3): 563–71.
4. Justewicz D.M., Shokes J.E., Reavis B. et al. Characterization of the human smooth muscle cell secretome for regenerative medicine. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2012.
5. Kim J.M., Kim J., Kim Y. et al. Comparative secretome analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenesis. *J. Cell Physiol*. 2012. Epub ahead of print.
6. Домарацкая Е.И., Стволовые клетки — резиденты костного мозга. *Известия Российской академии наук* 2011; 3: 261–72.
7. Pevsner-Fischer M., Levin S., Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev*. 2011; 7(3): 560–8.
8. Tziafas D., Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod*. 2010; 36(5): 781–9.
9. Yalvac M.E., Ramazanoglu M., Rizvanov AA. et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics* 2010; 10(2): 105–13.
10. Tarnok A., Ulrich H., Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry* 2010; 77(1): 6–10.
11. Gronthos S., Mankani M., Brahimi J. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS USA* 2000; 97(25): 13625–30.
12. Morsczeck C., Götz W., Schierholz J. et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005; 24(2): 155–65.
13. Yao S., Pan F., Prpic V. et al. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent. Res*. 2008; 87(8): 767–71.
14. Kerkis I., Ambrosio C.E., Kerkis A. et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J. Transl. Med*. 2008; 6: 35.
15. Nosrat I.V., Widenfalk J., Olson L. et al. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev. Biol*. 2001; 238(1): 120–32.
16. Storkebaum E., Lambrechts D., Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* 2004; 26(9): 943–54.
17. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat. Res*. 2004; 117: 3–32.
18. Sun Y., Jin K., Xie L. et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Clin. Invest*. 2003; 111(12): 1843–51.
19. Jin K., Zhu Y., Sun Y. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *PNAS USA* 2002; 99(18): 11946–50.
20. Yalvac M.E., Ramazanoglu M., Gumru O.Z. et al. Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electroporation. *Neurochem. Res*. 2009; 34(7): 1272–7.
21. Harris J.H., Graham J., Rickwood D. *Cell Biology Protocols*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2006.
22. Hawley T.S., Hawley R.G., Totowa N.J. *Flow Cytometry Protocols 2ed. Methods in Molecular Biology*. Humana Press; 2004.

Поступила 24.09.2012