

И.А. Васютин, С.Л. Кузнецов, А.В. Люндуп

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

# Стволовые клетки, выделенные из мочи: оценка потенциала дифференцировки

## В гладкомышечные клетки и клетки уротелия

**Обоснование.** Тканевая инженерия органов мочевой системы требует забора аутологичного биопсийного материала мочевого пузыря. В данном исследовании описан неинвазивный метод получения стволовых клеток из мочи и произведено исследование потенциала дифференцировки полученных стволовых клеток в клетки органов нижних мочевых путей — клетки уротелия и гладкомышечные клетки. **Цель исследования** — описать свойства стволовых клеток, получаемых из мочи (СКМ), и исследовать потенциал дифференцировки СКМ в клетки уротелия и гладкомышечные клетки в культуре. **Методы.** Выделение СКМ производилось у здоровых добровольцев отмыванием клеток от мочи с помощью центрифугирования и посадкой в культуральной среде на 24-луночные планшеты. Экспрессия СКМ маркеров постнатальных стволовых клеток (CD73, CD90, CD105, CD34, CD45, CD29, CD44, CD54, SSEA4) оценивалась с помощью проточной цитометрии. Экспрессия маркеров уротелия и гладкомышечных клеток оценивалась посредством флуоресцентной микроскопии с дальнейшим компьютерным анализом изображений. **Результаты.** Медиана количества СКМ в моче составила 6 клеток на 100 мл. Время удвоения популяции для культур СКМ —  $1,44 \pm 0,528$  сут ( $n=4$ ). Количество удвоенной популяции до вырождения культуры —  $26,3 \pm 4,79$  ( $n=4$ ). Медиана экспрессии СКМ второго пассажа маркеров стволовых клеток: CD73 — 79,8%, CD90 — 56,6%, CD105 — 40,7%, CD34 <1,0%, CD45 <2,0%, CD29 >99,0%, CD44 >99,0%, CD54 — 97,7%, SSEA4 >99,0%. После уротелиальной дифференцировки экспрессия цитокератинов (СК) увеличилась на 24,9% для СК AE1/AE3 и на 7,6% для СК 7. После гладкомышечной дифференцировки экспрессия маркеров гладкомышечных клеток увеличилась на 79,6% для  $\alpha$ SMA и на 97,6% для кальпонина. **Заключение.** СКМ — клетки, которые обнаружены в моче в малых количествах, имеют высокий пролиферативный потенциал и экспрессируют маркеры постнатальных стволовых клеток. Под воздействием факторов роста PDGF-BB и TGF- $\beta$ 1 СКМ способны к дифференцировке в гладкомышечные клетки в культуре.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, тканевая инженерия, урология, регенеративная медицина.

(Для цитирования: Васютин И.А., Кузнецов С.Л., Люндуп А.В. Стволовые клетки, выделенные из мочи: оценка потенциала дифференцировки в гладкомышечные клетки и клетки уротелия. Вестник РАМН. 2019;74(3):176–184. doi: 10.15690/vramn1131)

### Обоснование

Тканевая инженерия — развивающаяся область биомедицинской науки. Тканеинженерные эквиваленты тканей мочевыводящих путей могут быть использованы для заместительной пластики поврежденных и/или не-

функционирующих органов и для прецизионного моделирования патологических процессов мочевыводящих путей *in vitro*. В настоящее время заместительные пластики мочевого пузыря и мочеиспускательного канала проводятся с помощью трансплантации аутологичных тканей пациента. Для осуществления данного подхода

I.A. Vasyutin, S.L. Kuznetsov, A.V. Lyundup

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

## Urine-Derived Stem Cells: Differentiation Potential into Smooth-Muscle Cells and Urothelial Cell

**Background:** Tissue engineering of low urinary tract organs requires biopsy of urinary bladder material. The current study describes non-invasive approach of obtaining autologous stem cells from urine of healthy adults. These cells were studied for potential to differentiate into epithelial cells and smooth muscle cells of the urinary bladder. **Aims:** To describe properties of urine-derived stem cells (USCs) and investigate their differentiation potential for tissue engineering of low urinary tract organs. **Materials and Methods:** USCs were isolated from urine of healthy volunteers with centrifugation and seeded in media to 24-well plates. Expression of stem cells markers (CD73, CD90, CD105, CD34, CD45, CD29, CD44, CD54, SSEA4) by USCs was assessed with flow cytometry. Expression of specific markers of smooth muscle cells and urothelial cells was assessed with fluorescence microscopy with following computational image analysis. **Results:** Median number of USCs per 100 ml urine was 6. Doubling time for USC was  $1.44 \pm 0.528$  days ( $n=4$ ) and there were  $26.3 \pm 4.79$  population doublings for USC cultures ( $n=4$ ). Median expression of markers of postnatal stem cells was CD73 — 79.8%, CD90 — 56.6%, CD105 — 40.7%, CD34 <1.0%, CD45 <2.0%, CD29 >99.0%, CD44 >99.0%, CD54 — 97.7% and SSEA4 >99.0%. Treatment of cells with high concentration of EGF in media with low concentration of FBS for 10 days increased cytokeratin (CK) expression to 24.9% for CK AE1/AE3 and to 7.6% for CK 7. Treatment of USCs with media inducing smooth muscle differentiation for 10 days increased expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin to 79.6% and expression of calponin to 97.6%. **Conclusions:** USCs are cells that can be found in urine in small quantities. They have high proliferative potential and express markers of postnatal stem cells. Under effect of PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1 they differentiate into smooth muscle cells.

**Keywords:** stem cells, tissue engineering, urology, regenerative medicine.

(For citation: Vasyutin IA, Kuznetsov SL, Lyundup AV. Urine-derived stem cells: differentiation potential into smooth-muscle cells and urothelial cell. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2019;74(3):176–184. doi: 10.15690/vramn1131)

необходим забор значительного объема донорской ткани, что требует отдельного операционного вмешательства и может привести к дополнительным осложнениям [1]. Поэтому тканеинженерные конструкции мочевого пузыря и мочеиспускательного канала рассматриваются в качестве будущей замены аутологичных тканей для заместительной пластики органов мочевыводящих путей [2]. Кроме использования в хирургической практике, тканеинженерные конструкции стенки мочевого пузыря позволяют моделировать различные патологические процессы *in vitro*, такие как развитие карциномы мочевого пузыря и урогенитальные инфекции [3].

Для создания тканеинженерных конструкций стенки мочевого пузыря и мочеиспускательного канала необходимо использование клеток уротелия и гладкомышечных клеток [4, 5]. Как правило, эти клетки получают из биопсийного материала мочевого пузыря. Хотя процедура забора биопсии мочевого пузыря и была улучшена в последние годы, она остается достаточно сложной и болезненной для пациентов, поэтому различные исследовательские группы рассматривают альтернативные источники клеток для тканевой инженерии органов нижних мочевых путей [6–8]. Одной из таких альтернатив являются стволовые клетки. Так, были разработаны протоколы дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в клетки уротелия и гладкомышечные клетки [9, 10]. Однако применение этого типа клеток в клинической практике является небезопасным из-за их высокой туморогенности.

Для изготовления тканеинженерных конструкций нижних мочевых путей потенциально могут быть использованы постнатальные стволовые клетки. Например, мезенхимальные стромальные клетки, получаемые из различных тканей взрослого организма, могут быть дифференцированы *in vitro* в гладкомышечные клетки [11]. Однако для мезенхимальных стромальных клеток дифференцировка в клетки уротелия не показала удовлетворительных результатов, и единственным надежным источником клеток уротелия для тканевой инженерии остается биопсия мочевого пузыря [5]. В недавних исследованиях было описано наличие небольшого количества клеток в моче с высоким пролиферативным потенциалом и способностью под воздействием экзогенных факторов дифференцироваться в различные клетки организма [12, 13]. Эти клетки были названы стволовыми клетками из мочи (СКМ). СКМ экспрессируют на свои поверхности маркеры мезенхимальных стромальных клеток, но в отличие от последних СКМ также экспрессируют некоторые маркеры плюрипотентных стволовых клеток и обладают эпителиальным фенотипом. В ряде исследований была показана способность СКМ дифференцироваться в клетки уротелия в культуре под воздействием высоких концентраций эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF) [14].

**Целью данной работы** было выделение и описание свойств СКМ, а также проверка гипотезы возможности дифференцировки СКМ в клетки уротелия и гладкомышечные клетки.

## Методы

### 1. Выделение и культивирование стволовых клеток из мочи

Этическая экспертиза исследования была проведена Локальным этическим комитетом Первого МГМУ имени

И.М. Сеченова (протокол № 06-19 от 15.05.2019). От всех доноров мочи было получено информированное согласие на выделение клеток из мочи и использование выделенных клеток в исследованиях *in vitro*. Выделение стволовых клеток из мочи осуществлялось по протоколу, описанному ранее [9]. Образцы мочи в объеме 100–300 мл на образец были собраны у 6 здоровых добровольцев. Выделение клеток из мочи производилось посредством двукратного центрифугирования при 1500 rpm в течение 5 мин с отбором надосадочной жидкости и ресуспендированием клеток в фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline, PBS) после первого центрифугирования. После второго центрифугирования надосадочная жидкость забиралась с помощью аспиратора, а осадок, содержащий клетки, ресуспендировали в среде для культивирования СКМ. Среда для культивирования СКМ состояла из питательного субстрата для прогениторных клеток и бессывороточного — для кератиноцитов (KSFМ, Life Technologies, Inc.) в отношении 1:1. Среда для прогениторных клеток состояла из среды Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), и среды F12 в отношении 1:1 (Life Technologies, Inc.) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, GE Healthcare Life Sciences), 0,4 мкг/мл гидрокортизона (Sigma-Aldrich Corp.), 5 нг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферрина (Life Technologies, Inc.), 24,3 мкг/мл аденина (Sigma-Aldrich Corp.), 1,3 нг/мл трийодтиронина (T3, Sigma-Aldrich Corp.), 10 нг/мл EGF (Life Technologies, Inc.), 1% пенициллина-стрептомицина (Sigma-Aldrich Corp.). Среда с клетками была перенесена на 24-луночный культуральный планшет в объеме 1 мл на лунку. Первая замена среды проводилась через 3 дня после посадки клеток, дальнейшая замена проводилась каждые два дня. При достижении покрытия СКМ 20–30% поверхности лунки клетки пересевались на 6-луночные культуральные планшеты для дальнейшего культивирования.

### 2. Проточная цитометрия

Для проведения проточной цитометрии для оценки экспрессии поверхностных маркеров были использованы СКМ второго пассажа. Клетки были трипсинизированы, отмыты и помечены флуоресцентными антителами против CD73, CD90, CD105 (BD Biosciences), CD34, CD45, CD29, CD44, CD54 и SSEA4 (Life Technologies, Inc.). Анализ флуоресценции проводился с использованием клеточного сортера MoFlo (Beckman Coulter).

### 3. Выделение клеток уротелия и гладкомышечных клеток мочевого пузыря

Выделение клеток уротелия и гладкомышечных клеток мочевого пузыря проводилось из кадаверного материала мочевого пузыря человека. Фрагмент мочевого пузыря, содержащий слизистую оболочку и мышечный слой, отмывался в PBS, после чего проводилось выделение клеток. Для выделения клеток уротелия, слизистая мочевого пузыря отделялась от мышечного слоя с помощью ножниц. После этого слизистая нарезалась на фрагменты по 2–3 мм, которые помещались в 450 U/мл раствор коллагеназы IV при 37°C на 1–2 ч. Обработанные коллагеназой IV фрагменты слизистой дважды отмывались в PBS посредством центрифугирования, ресуспендировались и переносились в 25 см<sup>2</sup> культуральные флаконы, культуральная поверхность которых была обработана поли-L-лизиним (ScienCell Research Laboratories, Inc.). Для культивирования клеток уротелия использовалась среда KSFМ, замена среды осуществлялась каждые два дня. Для выделения гладкомышечных клеток использовался остав-

шийся мышечный слой мочевого пузыря. Сперва от фрагмента мышечного слоя с помощью ножниц удалялись остатки соединительной, жировой и васкулярной тканей. После этого фрагмент нарезался с помощью ножниц и скальпеля на мелкие фрагменты, которые переносились в 50 мл пробирку, содержащую 40 мл среды DMEM, 450 U/мл диспазы II, 450 U/мл коллагеназы IV и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. После этого раствор, содержащий обработанную ткань, отфильтровывали с помощью 100 мкм фильтра для удаления больших частиц ткани, клетки отмывали с помощью центрифугирования и переносили в среде DMEM с 10% FBS в культуральные флаконы. Смена среды осуществлялась каждые два дня.

#### 4. Дифференцировка

Для проведения дифференцировки в клетки уротелия СКМ второго пассажа были посеяны на культуральную посуду в концентрации 2000–4000 кл./см<sup>2</sup> в среде, состоящей из DMEM, содержащей 10% FBS, и KSFM в отношении 1:4 с добавлением 30 нг/мл EGF. Дифференцировка проводилась в течение 10 дней без пассирования. Смена среды проводилась каждые два дня. Для дифференцировки в гладкомышечные клетки СКМ второго пассажа были посеяны на культуральную посуду в концентрации 500–1500 кл./см<sup>2</sup> в среде, состоящей из DMEM, и среде для прогениторных клеток, описанной выше, в отношении 1:1 с добавлением 5 нг/мл тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB, Life Technologies, Inc.) и 2,5 нг/мл трансформирующего фактора роста β1 (TGF-β1, Life Technologies, Inc.). Дифференцировка проводилась в течение 10 дней без пассирования. Смена среды проводилась каждые два дня.

#### 5. Иммуноцитохимическое окрашивание

Для флуоресцентного окрашивания клетки в культуральных 24-луночных планшетах были зафиксированы с помощью 16% формальдегида, пермеабиллизованы с помощью Тритона X-100 и инкубированы при 4°C в течение ночи с первичными антителами против цитокератинов (cytokeratin, CK) AE1/AE3 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA5-13156), CK 7 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA1-06316), CK 13 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA5-12135) для оценки уротелиального фенотипа и против α-гладкомышечного актина (α-SMA, Thermo Fisher Scientific Inc., 14-9760-80), десмина (Abcam, ab32362) и кальпонины (Thermo Fisher Scientific Inc., MA5-11620) для оценки гладкомышечного фенотипа. После инкубации с первичными антителами клетки отмывали и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC или Texas Red (Vector Laboratories, Inc.), в течение 1 ч при комнатной температуре.

#### 6. Флуоресцентная микроскопия и количественный анализ

Для оценки интенсивности флуоресценции использовался флуоресцентный микроскоп IN Cell Analyzer 2000 (General Electric) с высокой пропускной способностью с последующим автоматическим анализом изображений. Количественные данные интенсивности флуоресценции, полученные после анализа изображений, были обработаны с помощью программного обеспечения R для получения агрегированных статистических показателей для каждого типа клеток, после чего делался вывод об уровне экспрессии маркеров клеток уротелия и гладкомышечных клеток. Для оценки экспрессии каждого маркера исполь-

зовались 5 различных клонов клеток СКМ. Для статистического анализа уровня экспрессии каждого из маркеров дифференцировки использовалось значение относительного уровня флуоресценции, полученного по формуле:

$$E_i = \frac{I_i - I_{NC}}{I_{PC} - I_{NC}},$$

где  $I_i$  — среднее значение интенсивности флуоресценции маркера для клона  $i$  СКМ,  $I_{NC}$  — среднее значение интенсивности флуоресценции отрицательного контроля (в качестве отрицательного контроля использовалось значение флуоресценции клеток, инкубированных только со вторичными антителами),  $I_{PC}$  — среднее значение флуоресценции положительного контроля (для маркеров клеток уротелия в качестве положительного контроля использовалась культура клеток уротелия, для гладкомышечных маркеров использовалась культура гладкомышечных клеток).

Описательная статистика для экспрессии каждого маркера, а также относительное изменение экспрессии маркеров после проведения дифференцировки приведены с использованием медианы и минимального–максимального значения (Me [мин.–макс.]) интенсивности флуоресценции. Статистическое сравнение уровней экспрессии каждого маркера до и после дифференцировки осуществлялось с использованием теста Стьюдента.

### Результаты

#### 1. Получение и культивирование клеток

СКМ были выделены у 6 здоровых добровольцев. Количество СКМ в моче было крайне мало (медиана — 6 клеток на 100 мл мочи). Первые клоны делящихся клеток были выявлены через 4–5 дней после посадки клеток на культуральную посуду (рис. 1). Количество клонов стволовых клеток в моче было крайне мало (медиана — 6 клонов на 100 мл мочи). Время удвоения популяции для культур стволовых клеток, выделенных из мочи, составило 1,44±0,528 сут ( $n=4$ ). Количество удвоений популяции до вырождения культуры — 26,3±4,79 ( $n=4$ ).

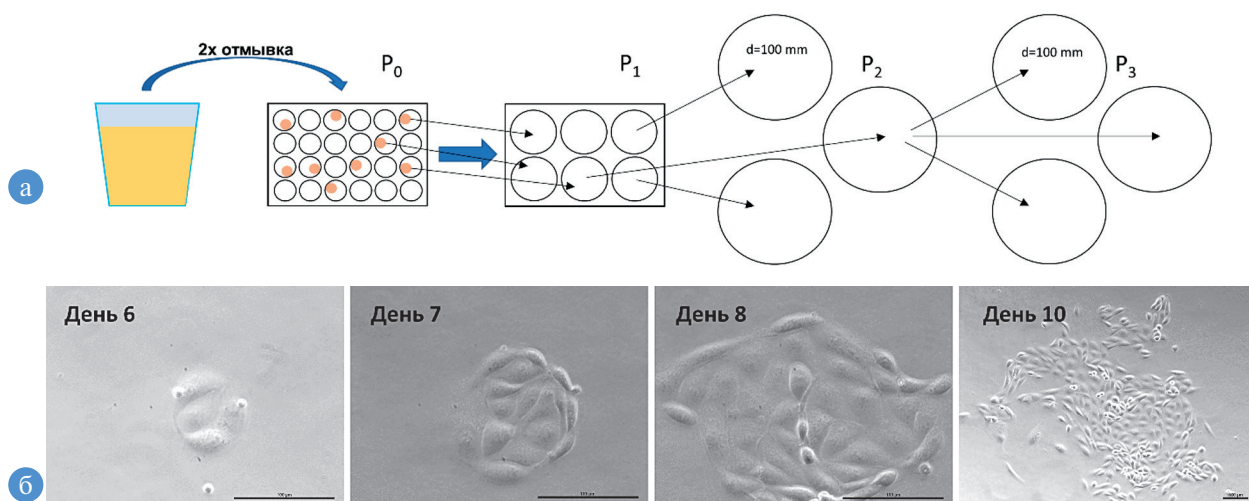
#### 2. Проточная цитометрия для оценки экспрессии маркеров стволовых клеток

Проточная цитометрия показала, что СКМ экспрессируют классические маркеры мезенхимальных стромальных клеток: CD73 — 79,8% [67,5–99,2], CD90 — 56,6% [10,2–99,6], CD105 — 40,7% [25,7–74,2] (рис. 2, а–в), при этом имеют отрицательную экспрессию маркеров гемопоэтических стловых клеток: CD34 <1,0% и CD45 <2,0% (рис. 2, г, д). Также СКМ обладают высокой экспрессией маркера плюрипотентных стволовых клеток: SSEA4 >99,0% и высокой экспрессией других маркеров, ассоциированных с тканеспецифичными стволовыми клетками: CD29 >99,0%, CD44 >99,0%, CD54 — 97,7% [95,5–99,0] (рис. 2, е–и). Результаты экспрессии маркеров согласуются с данными, представленными ранее, и подтверждают, что полученные клетки соответствуют СКМ.

#### 3. Фенотип клеток уротелия и гладкомышечных клеток мочевого пузыря в культуре

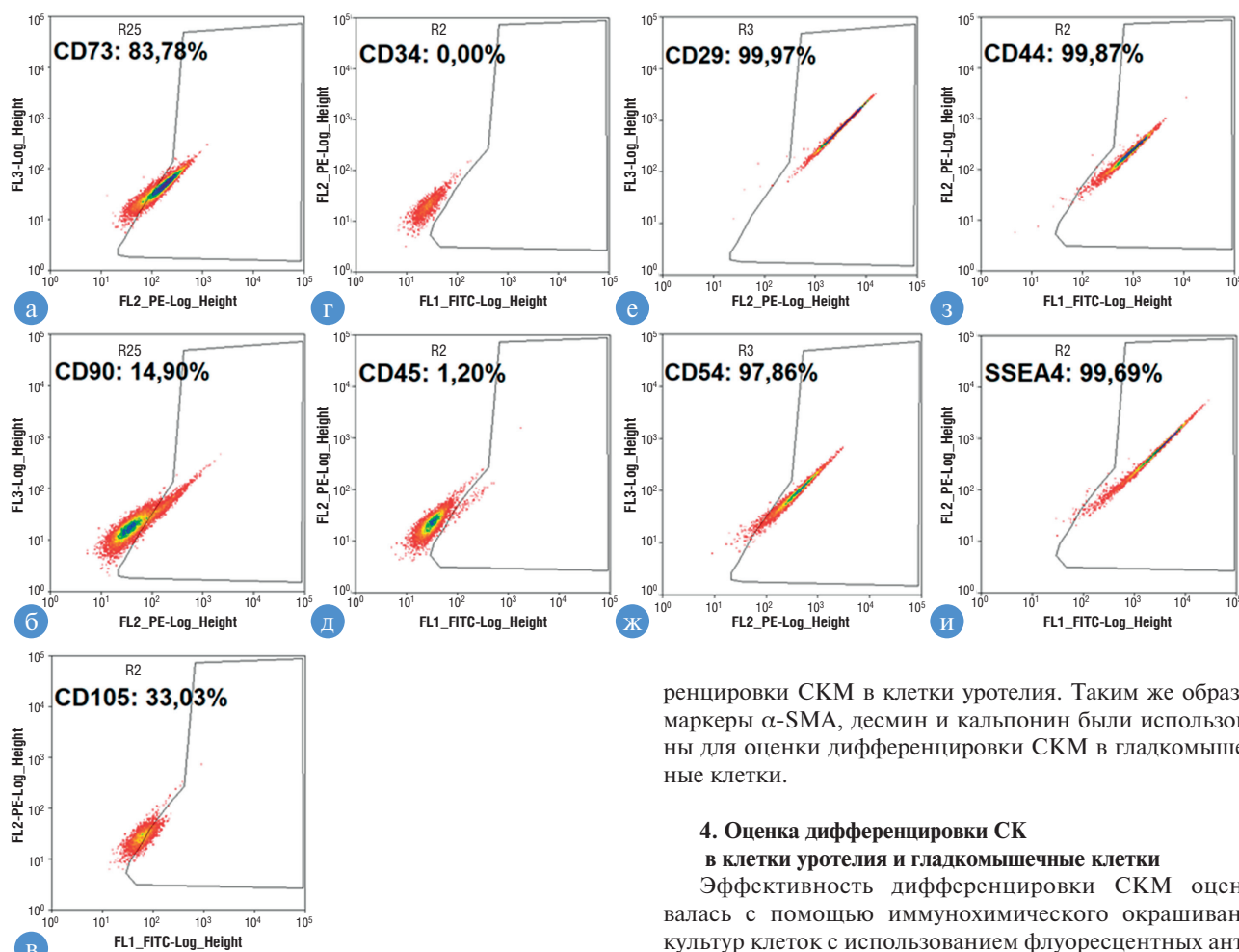
Для определения характеристик клеток уротелия и гладкомышечных клеток мочевого пузыря было проведено иммуноцитохимическое окрашивание клеток уротелия и гладкомышечных клеток в культуре на различные внутриклеточные маркеры. Для клеток уротелия в куль-





**Рис. 1.** Схема выделения стволовых клеток из мочи (а); рост клона СКМ в культуре (б): световая микроскопия

*Примечание.* СКМ — стволовые клетки из мочи.



**Рис. 2.** Проточная цитометрия СКМ

*Примечание.* СКМ — стволовые клетки из мочи.

туре была показана высокая экспрессия СК АЕ1/АЕ3, СК 7, СК 13 и низкая экспрессия СК 20 (рис. 3). Для гладкомышечных клеток была показана высокая экспрессия  $\alpha$ -SMA, десмина и кальпонины (рис. 4). В соответствии с результатами окрашивания маркеры СК АЕ1/АЕ3, СК 7 и СК 13 были выбраны как характеризующие для клеток уротелия в культуре и использованы для оценки диффе-

ренцировки СКМ в клетки уротелия. Таким же образом маркеры  $\alpha$ -SMA, десмин и кальпонин были использованы для оценки дифференцировки СКМ в гладкомышечные клетки.

#### 4. Оценка дифференцировки СК

##### в клетки уротелия и гладкомышечные клетки

Эффективность дифференцировки СКМ оценивалась с помощью иммунохимического окрашивания культур клеток с использованием флуоресцентных антител против специфических маркеров, характерных для клеток уротелия и гладкомышечных клеток. Интенсивность флуоресценции имеет прямую корреляцию с количеством соответствующего маркера в клетке, поэтому при одинаковой интенсивности испускаемого лазера и времени экспозиции интенсивность флуоресценции, измеренная с помощью анализа изображений, позволяет оценить относительное количество маркера в клетках. Интенсивность флуоресценции для каждого маркера в культуре СКМ оценивалась в период до и после дифференцировки и сравнивалась с положительным кон-

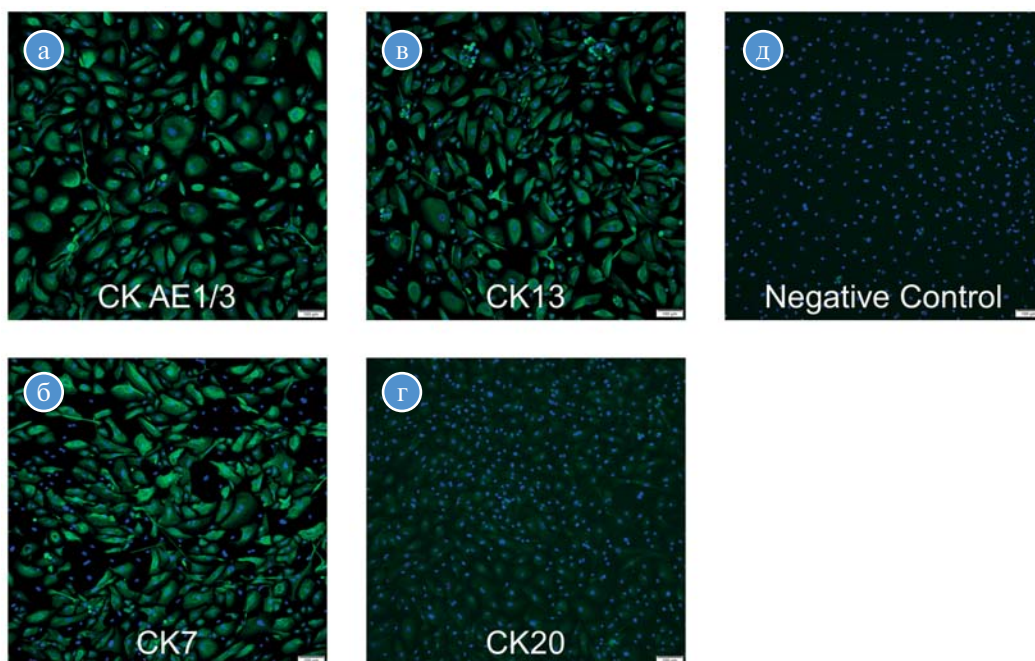


Рис. 3. Экспрессия цитокератинов клетками уротелия в культуре (флуоресцентная микроскопия): СК AE1/AE3 (а); СК 7 (б); СК 13 (в); СК 20 (г); отрицательный контроль — покраска клеток без первичных антител (д). Синий — DAPI.

180

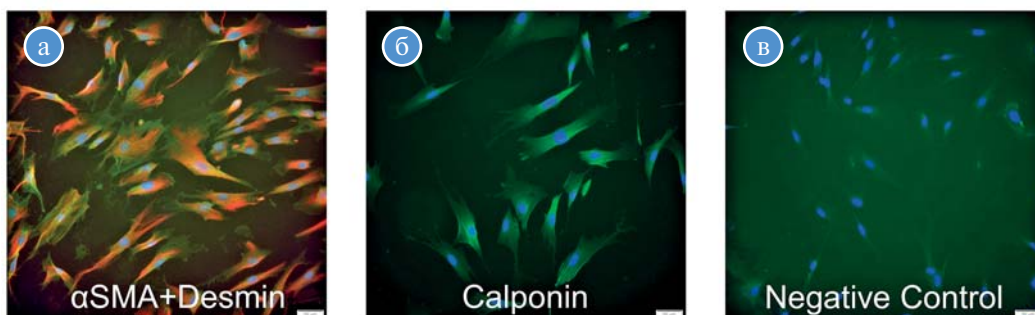


Рис. 4. Экспрессия филаментов гладкомышечными клетками в культуре (флуоресцентная микроскопия): αSMA (зеленый), десмин (красный) (а); кальпонины (б); отрицательный контроль — покраска клеток без первичных антител (в). Синий — DAPI.

тролем. Для маркера гладкомышечных клеток десмина количественного анализа изображений не проводилось, так как его внутриклеточная локализация крайне неоднородна (см. рис. 4, а). После содержания СКМ в среде для уротелиальной дифференцировки на протяжении 10 дней интенсивность флуоресценции изменилась на 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. К концу дифференци-

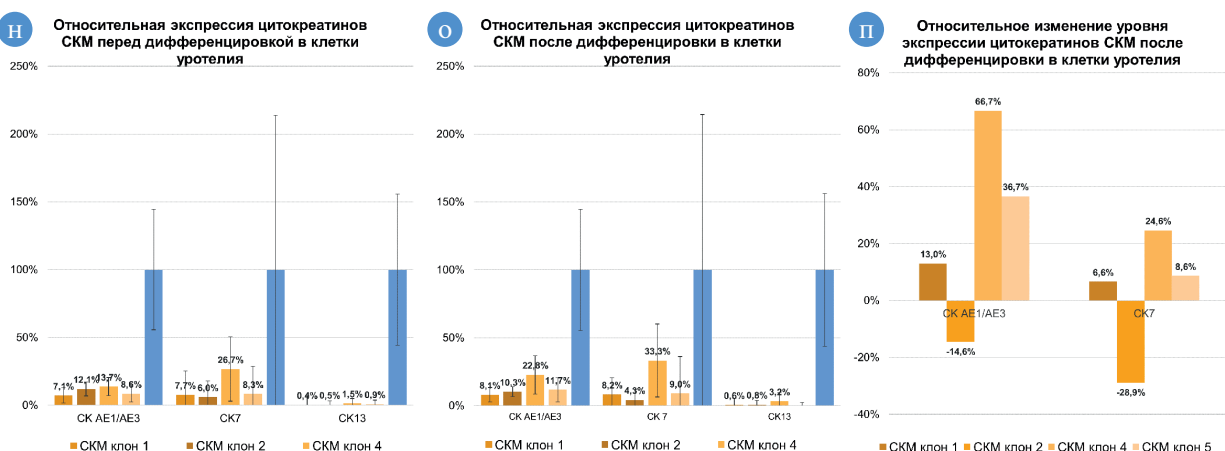
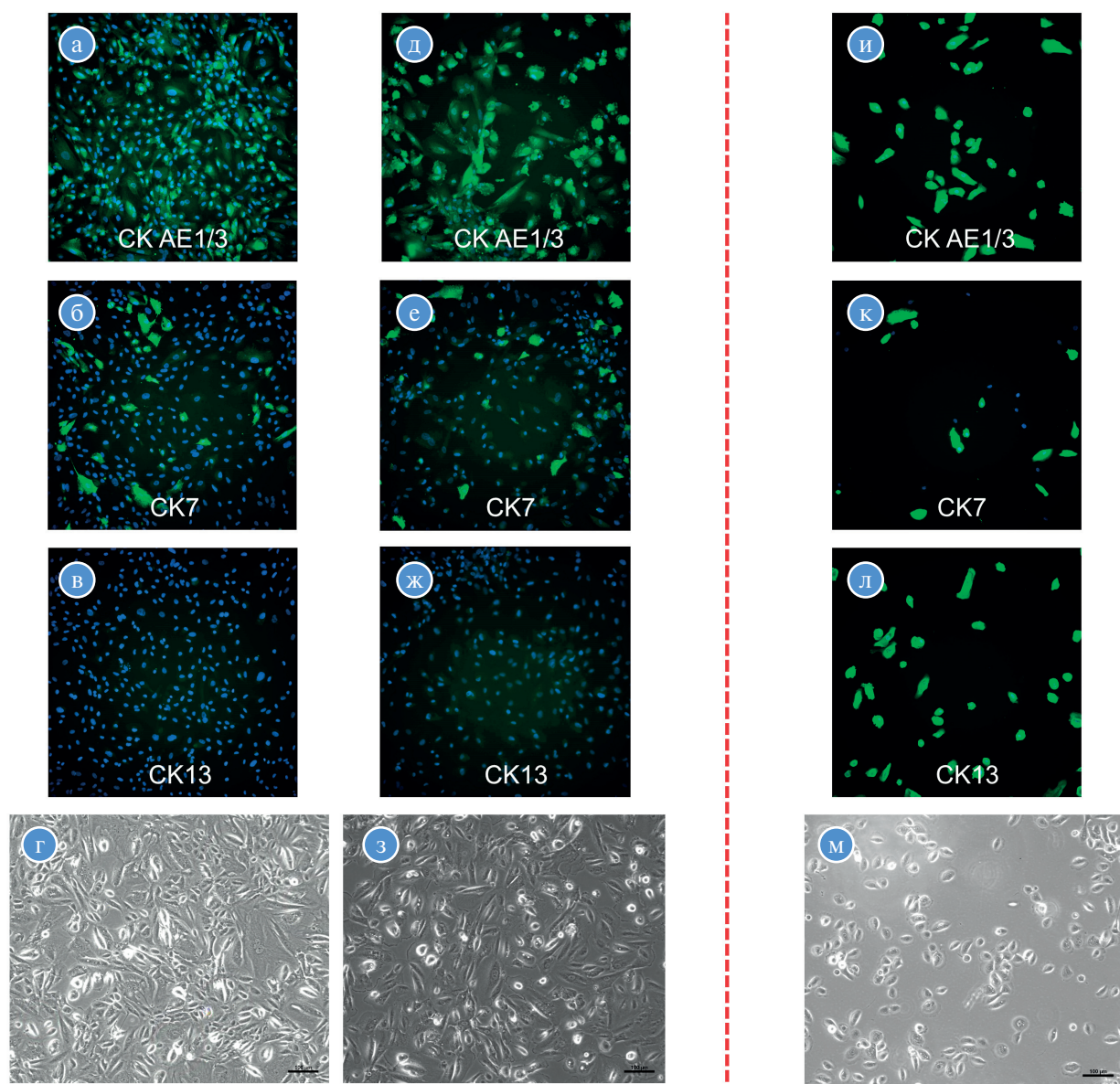
ровки интенсивность флуоресценции для СК AE1/AE3 и СК 7 составила 11,0% [8,1–22,8] и 8,6% [4,3–33,3] от положительного контроля соответственно. Для СК 13 интенсивность флуоресценции СКМ как до, так и после дифференцировки не отличалась от отрицательного контроля, в то время как для клеток уротелия интенсивность флуоресценции для СК 13 была значительной (табл., рис. 5).

Таблица. Относительные значения экспрессии маркеров до и после дифференцировки

Маркер дифференцировки	Относительный уровень экспрессии маркеров		Относительное изменение экспрессии маркера после дифференцировки Me [мин.–макс.]*
	До дифференцировки Me [мин.–макс.]	После дифференцировки Me [мин.–макс.]	
<i>Маркеры клеток уротелия</i>			
СК AE1/AE3	0,104 [0,071–0,137]	0,11 [0,081–0,228]	0,249 [-0,146–0,667] $p=0,2598$
СК 7	0,080 [0,060–0,267]	0,086 [0,043–0,333]	0,076 [-0,289–0,246] $p=0,9512$
СК 13	0,007 [0,004–0,015]	0,007 [-0,006–0,032]	-
<i>Маркеры гладкомышечных клеток</i>			
α-SMA	0,468 [0,277–0,659]	0,790 [0,570–0,867]	0,796 [0,213–1,192] $p=0,0115$
Кальпонин	0,376 [0,212–0,554]	0,668 [0,518–1,311]	0,976 [-0,064–2,488] $p=0,0379$

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.





**Рис. 5.** а–в: экспрессия цитокератинов в СКМ до дифференцировки (флуоресцентная микроскопия, синий — DAPI); д–ж: экспрессия цитокератинов в СКМ после дифференцировки в клетки уротелия (флуоресцентная микроскопия, синий — DAPI); г: световая микроскопия культуры СКМ до дифференцировки; з: световая микроскопия культуры СКМ после уротелиальной дифференцировки; и–л: экспрессия цитокератинов клетками уротелия в культуре (флуоресцентная микроскопия, синий — DAPI); м: световая микроскопия культуры клеток уротелия; н: относительный уровень экспрессии цитокератинов в различных клонах СКМ до дифференцировки; о: относительный уровень экспрессии цитокератинов в различных клонах СКМ после уротелиальной дифференцировки; п: относительное изменение уровня экспрессии цитокератинов после уротелиальной дифференцировки.

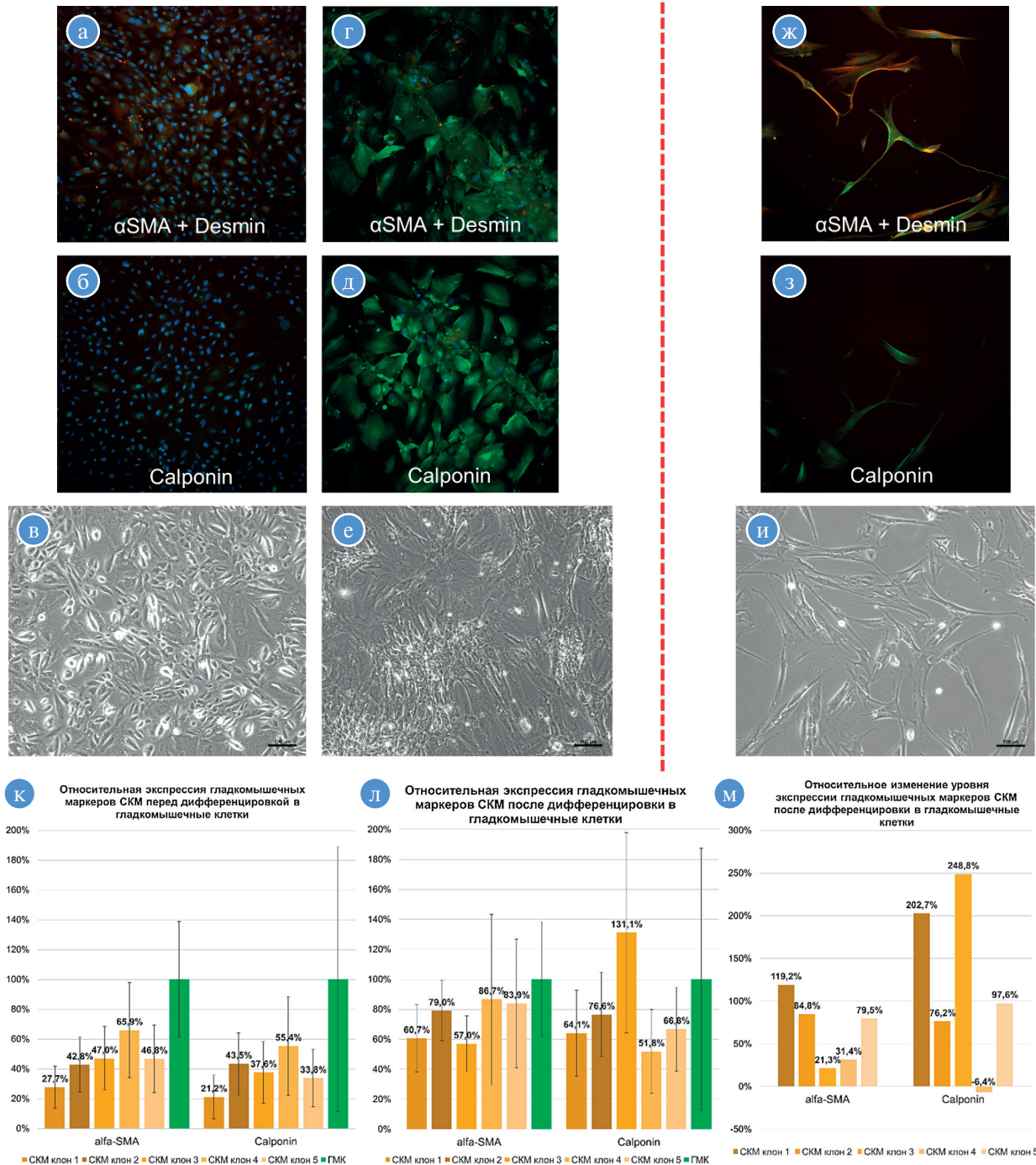
*Примечание.* СКМ — стволовые клетки из мочи.

После дифференцировки СКМ в гладкомышечные клетки на протяжении 10 дней интенсивность флуоресценции изменилась на 79,6% [21,3–119,2] ( $p=0,0115$ ) для  $\alpha$ SMA и 97,6% [-6,4–248,8] ( $p=0,03794$ ) для кальпонина. К концу дифференцировки интенсивность флуоресценции для  $\alpha$ SMA составила 79,0% [57,0–86,7], а для кальпонина — 66,8% [51,8–131,1] от интенсивности флуоресценции в культуре гладкомышечных клеток мочевого пузыря (см. табл., рис. 6).

**Обсуждение**

**Резюме основного результата исследования**

Содержание СКМ в среде с высокой концентрацией EGF в течение 10 дней не приводило к значимому повышению экспрессии маркеров клеток уротелия СКМ: 24,9% ( $p=0,2598$ ) и 7,6% ( $p=0,9512$ ) для СК AE1/AE3 и СК 7 соответственно. Содержание СКМ в среде с TGF- $\beta$ 1 и PDGF-BB приводило к увеличению экспрессии СКМ



**Рис. 6.** а, б: экспрессия миофиламентов в СКМ до дифференцировки (флуоресцентная микроскопия, синий — DAPI); г, д: экспрессия миофиламентов в СКМ после дифференцировки в гладкомышечные клетки (флуоресцентная микроскопия, синий — DAPI); в: световая микроскопия культуры СКМ до дифференцировки; е: световая микроскопия культуры СКМ после дифференцировки в гладкомышечные клетки; ж, з: экспрессия миофиламентов гладкомышечными клетками в культуре (флуоресцентная микроскопия, синий — DAPI); и: световая микроскопия культуры гладкомышечных клеток; к: относительный уровень экспрессии миофиламентов в различных клонах СКМ до дифференцировки; л: относительный уровень экспрессии миофиламентов в различных клонах СКМ после гладкомышечной дифференцировки; м: относительное изменение уровня экспрессии миофиламентов после гладкомышечной дифференцировки.



маркеров гладкомышечных клеток: 79,6% ( $p=0,0115$ ) и 97,6% ( $p=0,0379$ ) относительно исходного уровня для  $\alpha$ SMA и кальпонина соответственно.

### Обсуждение основного результата исследования

Стволовые клетки, выделяемые из мочи, являются клетками с высоким пролиферативным потенциалом. СКМ экспрессируют на своей поверхности маркеры мезенхимальных стромальных клеток CD73, CD90, CD105, однако эта экспрессия у СКМ в целом ниже, чем у мезенхимальных стромальных клеток. В отличие от мезенхимальных стромальных клеток, СКМ имеют эпителиальный фенотип. Кроме показанной в данной работе экспрессии СК AE1/AE3 и СК 7, мы выявили положительную окраску СКМ на протеин плотных контактов ZO-1 в культуре при достижении конfluence.

В данной работе мы определили набор внутриклеточных элементов цитоскелета как свойства, характеризующие клетки уротелия и гладкомышечные клетки. Цитокератины — это жесткие промежуточные филаменты, характерные для эпителиальных клеток, обеспечивающие механическую прочность и поддержание формы эпителиальных клеток. Мы использовали антитела к панцитокератину (СК AE1/AE3), которые распознают консервативный домен, присутствующий у множества видов цитокератинов, для оценки общего уровня экспрессии СК в клетке, а также антитела против СК 7 и СК 13 для оценки экспрессии цитокератинов, характерных для клеток уротелия. В свою очередь, для гладкомышечных клеток характеризующими элементами цитоскелета были выбраны структурные составляющие гладкомышечных филаментов —  $\alpha$ SMA, десмин, кальпонин.

Несмотря на то, что цитоскелет СКМ имеет в своем составе цитокератины, на основании полученных нами данных, уровень экспрессии цитокератинов в СКМ значительно ниже, чем в клетках уротелия. Кроме того, набор цитокератинов в СКМ различается с набором цитокератинов в клетках уротелия: так, СКМ не экспрессируют СК 13, тогда как в клетках уротелия выявлена высокая экспрессия этого цитокератина. Содержание СКМ в среде с низким содержанием сыворотки и высоким содержанием EGF не показало значительного увеличения содержания цитокератинов в СКМ. Этот факт вместе с тем, что экспрессия СК 13 СКМ в конце периода уротелиальной дифференцировки осталась отрицательной, позволяет нам утверждать, что СКМ не дифференцируются в клетки уротелия в культуре под воздействием высоких концентраций EGF.

В отличие от уротелиальной дифференцировки, СКМ под воздействием факторов роста PDGF-BB и TGF- $\beta$ 1 в течение 10 дней значительно увеличивают экспрессию структурных белков гладкомышечных филаментов  $\alpha$ SMA, десмина и кальпонина. Эти данные подтверждают результаты предыдущих исследований и позволяют предложить СКМ в качестве источника гладкомышечных клеток для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

### Ограничения исследования

В данном исследовании были получены достоверные данные увеличения экспрессии маркеров гладкомышечных клеток стволовыми клетками мочи в культуре под воздействием TGF- $\beta$ 1 и PDGF-BB. Между тем остаются открытыми вопросы о сохранности клетками гладкомышечного фенотипа в тканеинженерной конструкции после трансплантации, а также выживаемости клеток. Для проверки этой гипотезы необходимо проведение исследований тканеинженерной конструкции с использованием животных моделей. Хотя нами не были получены данные, что СКМ способны к дифференцировке в клетки уротелия, следует отметить, что мы использовали только один метод по дифференцировке СКМ в клетки уротелия. Данный метод заключается в содержании стволовых клеток в среде с высокой концентрацией EGF — индуктора эпителиальной дифференцировки. Возможно, использование иных факторов приведет к более эффективной дифференцировке СКМ в клетки уротелия. Так, в исследовании по дифференцировке эмбриональных стволовых клеток в клетки уротелия *in vitro* в финальные фазы дифференцировки был использован активатор транскрипционного индуктора экспрессии уроплакинов PPAR $\gamma$  [8].

### Заключение

Стволовые клетки из мочи имеют высокий пролиферативный потенциал, экспрессируют на своей поверхности маркеры мезенхимальных стромальных клеток и имеют эпителиальный фенотип. Эти клетки способны к дифференцировке в гладкомышечные клетки *in vitro* под воздействием TGF- $\beta$ 1 и PDGF-BB, в то время как высокие концентрации EGF не приводят к дифференцировке СКМ в клетки уротелия.

### Дополнительная информация

**Источник финансирования.** Данная работа была выполнена на базе лаборатории Института регенеративной медицины Университета Уэйк Форест (Уинстон-Сейлем, Северная Каролина, США) без привлечения внешних источников финансирования.

**Конфликт интересов.** Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

**Участие авторов:** Васютин И.А., Люндуп А.В., Кузнецов С.Л. — разработка дизайна экспериментов, интерпретация результатов, написание статьи; Люндуп А.В., Кузнецов С.Л. — руководство; Васютин И.А. — проведение экспериментов, обсчет результатов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

### ЛИТЕРАТУРА

- Lee YJ, Kim SW. Current management of urethral stricture. *Korean J Urol.* 2013;54(9):561–569. doi: 10.4111/kju.2013.54.9.561.2.
- Atala A, Kasper FK, Mikos AG. Engineering complex tissues. *Sci Transl Med.* 2012;4(160):160rv12. doi: 10.1126/scitranslmed.3004890.3.
- Vasyutin I, Zerihun L, Ivan C, Atala A. Bladder organoids and spheroids: potential tools for normal and diseased tissue modelling. *Anticancer Res.* 2019;39(3):1105–1118. doi: 10.21873/anticancer.13219.4.
- Васютин И.А., Люндуп А.В., Винаров А.З., и др. Реконструкция уретры с помощью технологий тканевой инженерии //



- Вестник РАМН.* — 2017. — Т.72. — №1. — С. 17–25. [Vasyutin IA, Lyundup AV, Vinarov AZ, et al. Urethra reconstruction with tissue-engineering technology. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2017;72(1):17–25. (In Russ.)] doi: 10.15690/vramn771.
5. Orabi H, AbouShwareb T, Zhang Y, et al. Cell-seeded tubularized scaffolds for reconstruction of long urethral defects: a preclinical study. *Eur Urol.* 2013;63(3):531–538. doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.041.6.
  6. Atala A, Danilevskiy M, Lyundup A, et al. The potential role of tissue-engineered urethral substitution: clinical and preclinical studies. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(1):3–19. doi: 10.1002/term.2112.7.
  7. Bhargava S, Patterson JM, Inman RD, et al. Tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty-clinical outcomes. *Eur Urol.* 2008;53(6):1263–1269. doi: 10.1016/j.eururo.2008.01.061.8.
  8. Yang B, Zheng JH, Zhang YY. Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells for muscle regeneration in urinary tract. *Chin Med J (Engl).* 2013;126(15):2952–2959. doi: 10.5772/55961.
  9. Osborn SL, Thangappan R, Luria A, et al. Induction of human embryonic and induced pluripotent stem cells into urothelium. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(5):610–619. doi: 10.5966/sctm.2013-0131.10.
  10. Wang Z, Wen Y, Li YH, et al. Smooth muscle precursor cells derived from human pluripotent stem cells for treatment of stress urinary incontinence. *Stem Cells Dev.* 2016;25(6):453–461. doi: 10.1089/scd.2015.0343.11.
  11. Kanematsu A, Yamamoto S, Iwai-Kanai E, et al. Induction of smooth muscle cell-like phenotype in marrow-derived cells among regenerating urinary bladder smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 2005;166(2):565–573. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62278-X.
  12. Zhang Y, McNeill E, Tian H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol.* 2008;180(5):2226–2233. doi: 10.1016/j.juro.2008.07.023.14.
  13. Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells.* 2013;31(9):1840–1856. doi: 10.1002/stem.1424.15.
  14. Shi JG, Fu WJ, Wang XX, et al. Transdifferentiation of human adipose-derived stem cells into urothelial cells: potential for urinary tract tissue engineering. *Cell Tissue Res.* 2012;347(3):737–746. doi: 10.1007/s00441-011-1317-0.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Васютин Игорь Алексеевич**, аспирант [Igor A. Vasyutin, MD]; адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2 [address: 8 bld 2, Trubetskaya street, 119991 Moscow, Russia], e-mail: ivasyutin@yahoo.com, SPIN-код: 1872-8347, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0594-7423>

**Людуп Алексей Валерьевич**, к.м.н. [Aleksey V. Lyundup, MD, PhD]; e-mail: lyundup@gmail.com, SPIN-код: 4954-3004, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0102-5491>

**Кузнецов Сергей Львович**, д.м.н., профессор, член-корр. РАН [Sergey L. Kuznetsov, MD, PhD, Professor]; e-mail: vakmedbiol@rambler.ru, SPIN-код: 3824-2646, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0704-1660>