

УДК 576.32/.36

Студ. К. А. Матиевский

Науч. рук. вед. науч. сотр. З. Б. Квачева\*; ст. преп. А. П. Райский\*\*

(\*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,

\*\*кафедра биотехнологии и биоэкологии, БГТУ)

## **ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ОСТЕОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ**

**Введение.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) играют важную роль в регенерации тканей и органов организма и имеют большой терапевтический потенциал. Интерес к остеогенному потенциалу МСК жировой ткани (ЖТ) основан на проблеме оптимизации репаративного остеогенеза, которая многие десятилетия остаётся одной из наиболее значимых, но так окончательно и не решенной ни в стоматологии, ни в травматологии и ортопедии.

На данный момент нет единого протокола дифференцировки МСК ЖТ в остеогенном направлении, который бы обеспечивал накопление необходимой биомассы клеток-предшественниц остеоцитов, для использования их в клеточной терапии.

В связи с этим, целью данных исследований явилось определение наиболее оптимальных условий и состава дифференцировочной среды для индукции остеогенеза в культурах МСК ЖТ при использовании различных индукторов остеогенной дифференцировки.

**Материалы и методы.** Выделение МСК из ЖТ человека и их культивирование проводили по стандартной методике [1, 2].

На основании анализа протоколов остеогенной дифференцировки МСК, описанных в литературе [3], а также на основании собственных исследований, были скомпонованы и исследованы различные варианты дифференцировочных сред:

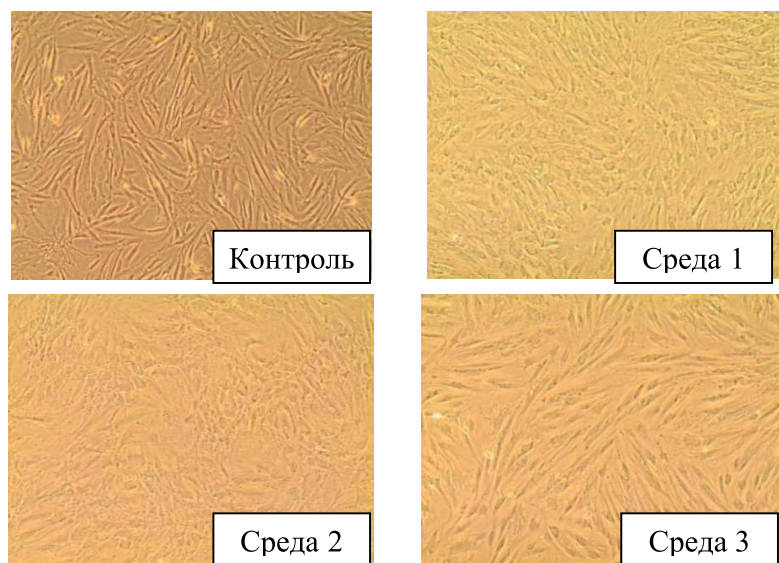
- среда 1 – контроль остеогенной дифференцировки – коммерческая среда (STEMPRO Osteogenesis Differentiation Kit, Invitrogen Gibco);
- среда 2 – дексаметазон, аскорбиновая кислота,  $\beta$ -глицерол-2-фосфат, морфогенетический костный белок BMP2;
- среда 3 – витамин D3, аскорбиновая кислота,  $\beta$ -глицерол-2-фосфат, BMP2.

Оценку результатов проводили по истечении 7, 14, 21 суток после внесения дифференцировочных сред в монослойные культуры МСК ЖТ (3 пас, 3-и сутки роста *in vitro*).

**Результаты.** Исследуемые культуры экспрессировали поверхностные маркеры CD44, CD73, CD90, CD105 и не экспрессировали

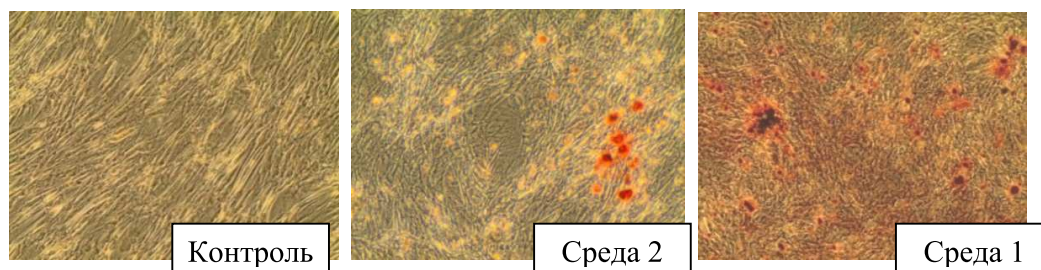
гемопоэтические маркеры CD34, CD45, что говорит об их принадлежности к МСК [4].

При культивировании МСК ЖТ в дифференцировочных средах в течение 7-14 дней наблюдались морфологические изменения в культурах: появление полигональной формы клеток, замедление и остановкой их пролиферации. Наибольшая степень выраженности данных изменений отмечена при использовании дифференцировочных сред № 1 и № 2 при наблюдении за культурами через 21 сутки (рисунок 1).



**Рисунок 1 – Изменение морфологии МСК ЖТ на 7-е сутки культивирования с индукторами дифференцировки (x40)**

Остеогенная дифференцировка в культурах МСК ЖТ подтверждена при окраске их ализариновым красным (рисунок 2).



**Рисунок 2 – Отложения оссификатов и фосфатов кальция в культурах МСК ЖТ на 21 сутки культивирования в средах № 1 и № 2 (x40)**

Остеогенная дифференцировка в культурах также подтверждена экспрессией молекулярно-генетических маркеров остеогенной дифференцировки: гена остеопонтина и щелочной фосфатазы, обратной ПЦР в реальном времени (рисунок 3).

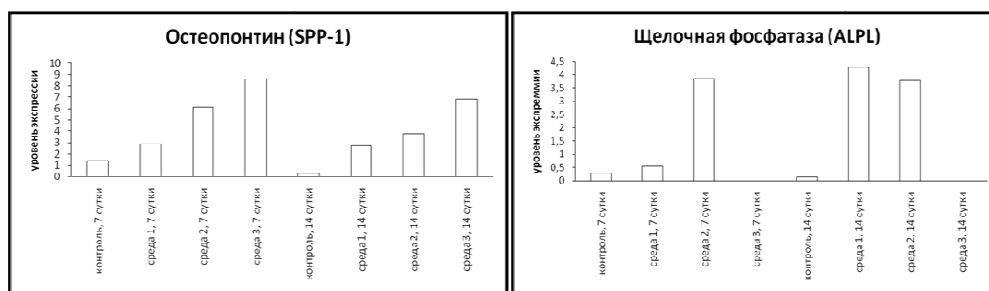


Рисунок 3 – Уровень экспрессии гена щелочной фосфатазы и остеопонтина в культурах МСК ЖТ, культивируемых в дифференцировочных средах

### Основные выводы:

1. На основании полученных данных оптимальной средой для дифференцировки МСК ЖТ в остеогенном направлении служит среда № 2, следующего состава: дексаметазон в концентрации 100 нМ, L-аскорбиновая кислота - 50 мкг/мл, β-глицерол-2-фосфат - 10 мМ, морфогенетический костный белок BMP2 – 50 нг/мл.

2. Разработанный протокол остеогенной дифференцировки культивированных МСК ЖТ человека может быть использован для наработки биомедицинского клеточного продукта, готового к использованию на 7-е сутки – культуры предшественников остеоцитов, для применения их в регенеративной медицине.

### ЛИТЕРАТУРА

1 Баранов Е.В. Клинические возможности применения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при лечении пациентов с трофическими язвами нижних конечностей / Баранов Е.В., Третьяк С.И., Василевич И.Б., Лобанок Е.С., Волотовский И.Д. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2013. - Т. 8. - № 2. - С.79-84.

2 Zuk P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. / Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. // Mol Biol Cell. – 2002. – 13. – S. 4279-4295

3 Fiorentini, E. Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells / E. Fiorentini // Int O Artif Organs. – 2011. - №34. – V.10. - P.998-1011.

4 Кирик В.М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине / Кирик В.М., Бутенко Г.М. // Журн. АМН Украины. – 2010. – Т.16. - №4. – С. 576 – 604.