УДК 576.371:611.018.46

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ В ОСТЕОГЕННОМ И АДИПОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИЯХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА КЛОНАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Н. Г. Скоробогатова
Ю. А. Петренко
Н. А. Волкова
А. Ю. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: skorng@mail.ru

Исследовали иммунофенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга (КМ) человека. Выделение индивидуальных колоний позволило исследовать колониеобразующие и дифференцировочные свойства клеток в пределах отдельных субпопуляций. Клетки — производные крупных колоний обнаруживали высокую способность к экспансии и индуцированной мезенхимальной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях. При культивировании в смеси остеогенной и адипогенной индуктивных сред МСК КМ преимущественно вступали в остеогенную дифференцировку.

Ключевые слова: костный мозг, мезенхимальные стромальные клетки, дифференцировка.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) костного мозга (КМ) представляют резерв для регенерации тканей взрослого организма. Способность МСК дифференцироваться в различные типы клеток определяет их особую ценность для биотехнологии, клеточной биологии и регенеративной медицины. В настоящее время установлены уникальные иммунобиологические, пролиферативные и дифференцировочные свойства этих клеток [1–4]. Известно, что пул МСК КМ неоднороден и включает мультипотентные стволовые клетки и детерминированные клетки-предшественники. Многие авторы представляют МСК КМ в виде иерархии стволовых и прогениторных клеток [5–7]. Одним из специфических свойств МСК является колониеобразование. При этом установлено, что только около 30% колониеобразующих мезенхимальных клеток КМ взрослых людей являются мультипотентными, т. е. способными к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях [5]. Так, клональные исследования, проведенные Muraglia et al., показали, что в КМ среди колониеобразующих МСК преобладают бипотентные остеохондральные предшественники (около 70%), а мультипотентные клетки составляют в среднем 24% [7]. Иными словами, колониеобразующие мезенхимальные предшественники имеют различный биологический потенциал, изучение которого важно для их экспериментального и клинического применения.

До сих пор нерешенной остается задача выделения наиболее ранних представителей МСК. В предыдущих исследованиях нами было проведено культивирование и изучение дифференцировочных свойств МСК, полученных из печени, мезенхимально-мезодермальных тканей плодов, а также костного мозга и жировой ткани взрослого человека [8, 9]. Было показано, что стромальные клетки, выделенные изо всех источников, характеризовались клоногенным ростом и способностью к экспансии и индуцированным дифференцировкам в остеогенном и адипогенном направлениях. При этом изучению подвергалась общая популяция стромальных клеток без учета ее гетерогенности. В настоящей работе была предпринята попытка оценить популяционный состав стромальных клеток КМ человека путем фе-

нотипического анализа и выделить клетки с наиболее высоким пролиферативно-дифференцировочным потенциалом. Цель работы — определение фенотипа стромальных клеток костного мозга человека, а также выделение индивидуальных колоний МСК и исследование их остеогенных и адипогенных свойств после экспансии.

Материалы и методы

Объектом исследования служили мезенхимальные стромальные клетки КМ человека, получение и изучение которых проводилось в соответствии с нормами биоэтики.

Первичные суспензии клеток КМ были получены путем вымывания физиологической средой из спонгиозной костной ткани с последующим центрифугированием (200 g) в течение 10 мин. Содержание ядросодержащих клеток определяли в камере Горяева при стандартном подсчете с 3%-й уксусной кислотой.

Получение культуры МСК

Клетки первичной суспензии КМ ($n = 4$) культивировали в среде alpha-MEM (Sigma, США), дополненной 15% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота (БиолоТ, Россия), при посеве 100 000 ядросодержащих клеток/см^2. Субкультивирование МСК проводили в той же ростовой среде. Клетки снимали с помощью смеси трипсина и версена и пересевали с коэффициентом 1:3. На 2-м пассаже исследовали фенотип и дифференцировочный потенциал культивированных клеток. Общую морфологию культивированных клеток оценивали после окрашивания азур-эозином.

Выделение индивидуальных колоний МСК

Клетки первичной суспензии КМ, полученные от двух доноров, рассевали в 24-луночных планшетах (Nunc, США) в интервале концентраций 3 000–30 000 ядросодержащих клеток/см^2. Выделение клеток из одиночных колоний осуществляли механически после предварительной обработки раствором Версена. Клетки от каждой колонии ресуспендировали в ростовой среде alpha-MEM, дополненной 15% ЭС, и пересевали в отдельные лунки 6-луночного планшета (Nunc, США). На 2-м пассаже проводили экспансию МСК. Для этих целей клетки пересевали в культуральные флаконы 25 см^2 (Nunc, США) и культивировали в той же ростовой среде.

Иммунофенотипические исследования осуществляли с использованием проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки 2-го пассажа окрашивали FITC или PE, конъюгированными моноклональными антителами: CD29-PE (Serotec, Великобритания), CD34-FITC (Dako, Дания), CD45-PE (Serotec, Великобритания), CD73-PE (BD Biosciences, США), CD90-FITC (Serotec, Великобритания), CD105-FITC (Serotec, Великобритания), затем анализировали на проточном цитометре FACS Calibur (BD Biosciences, США).

Остеогенный и адипогенный потенциал МСК определяли после субкультивирования стромальных клеток и экспансии одиночных колоний.

Для направленной дифференцировки клетки на 3-м пассаже эксплантировали с исходной концентрацией 3 000/см^2 и культивировали в течение 3 нед в специальных индуктивных средах. В работе использовали индуктивные среды трех типов: 1) остеогенную среду alpha-MEM, содержавшую 0,1 мкМ дексаметазона, 0,05 мМ аскорбиновой кислоты, 10 мМ глицерол-2-фосфата и 10% ЭС; 2) адипогенную среду alpha-MEM, дополненную 10% Adipogenic Stimulatory Supplements (Stem Cell Technologies Inc., Канада); 3) комбинированную остео/адипосреду — смесь остеогенной и адипогенной сред, приготовленную из вышеуказанных индуктивных сред удвоенной концентрации. Экспрессию щелочной фосфатазы в остеогенных клетках выявляли с помощью набора Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution (Sigma, США); минерализацию внеклеточного матрикса оценивали с помощью окрашивания по Ван-Коссу [10]. Адипогенные клетки определяли при окрашивании масляным красным Oil Red O [11].

Результаты и обсуждение

Характеристика культуры МСК

На первом этапе исследования при монослойном культивировании клеток КМ человека была получена адгезивная фракция, которая дала начало первичной поликлональной культуре стромальных клеток. В ней присутствовали колонии фибробластоподобных клеток различного размера. После субкультивирования уже на 2-м пассаже преобладали стромальные клетки, имеющие удлиненную веретеноподобную или треугольную форму (рис. 1) и характеризующиеся экспрессией антигенов CD29, CD73, CD90, CD105 (рис. 2).

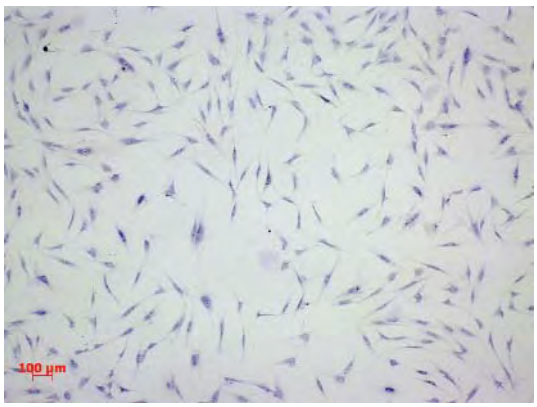

Рис. 1. **Культура МСК КМ человека** (2-й пассаж, 3-и сут, окрашивание азур-эозином)

Содержание клеток, экспрессировавших данные маркеры, составляло около 95% (рис. 2). В то же время изученные клетки не экспрессировали маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD34, а также общий маркер гемопоэтических клеток CD45. Культивирование стромальных клеток в остеогенной и адипогенной индуктивных средах приводило к их направленным остеогенной и адипогенной дифференцировкам. На основании выявленного нами иммунофенотипа CD29+, CD73+, CD90+ CD105+, CD34–, CD45– и дифференцировочного остеогенного и адипогенного потенциала исследуемые клетки были отнесены к МСК [12].

Свойства индивидуальных колоний МСК КМ

Известно, что культивирование клеток КМ при низкой плотности посева позволяет выявлять колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕф), представляющие собой наиболее ранние представители пула стромальных клеток [13]. С использованием лимитирующего разведения и посева в диапазоне 3 000–30 000 ядросодержащих клеток/см^2 наблюдалось формирование индивидуальных фибробластных колоний, частота встречаемости которых в первичной культуре была 2–3 на 100 000 ядросодержащих клеток. В этих условиях культивирования формировались колонии трех типов, различающиеся по их размеру и характеру упаковки клеток. Крупными считали колонии, в состав которых входило более 500 фибробластоподобных клеток, плотно упакованных в центре колонии, средние колонии (от 100 до 500 клеток) имели разреженное расположение клеток, мелкие содержали до 100 рыхло расположенных клеток. Известно, что различия в морфологии колоний указывают на разнокачественность КОЕф в пределах одной популяции стромальных клеток [14]. Для анализа отбирали лунки, содержавшие по одной большой или средней колонии фибробластоподобных клеток. В эксперимент были отобраны 5 крупных колоний и 2 средние. После выделения индивидуальных колоний и последующего пересева

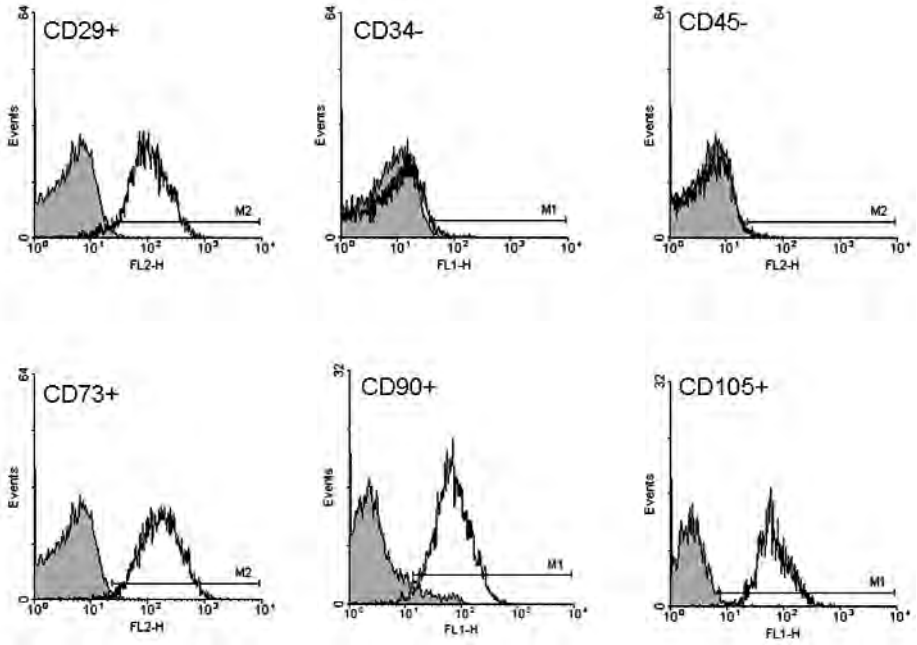

Рис. 2. **Иммунофенотип МСК КМ человека** (2-й пассаж)

наблюдали образование новых. При этом каждая колония давала начало 14–19 КОЕф.

В дальнейшем была проведена экспансия МСК из индивидуальных колоний. Потомки крупных колоний активно пролиферировали и формировали конфлюэнтный монослой. МСК из колоний среднего размера, дающие на первом пассаже начало новым КОЕф, при последующем субкультивировании характеризовались более низкой пролиферативной активностью и были неспособны к экспансии. Полученные данные свидетельствовали о высоком пролиферативном потенциале КОЕф, формировавших крупные колонии в первичной культуре.

Исследование дифференцировочных свойств МСК — производных индивидуальных колоний

После экспансии МСК — потомков крупных колоний их субкультивировали в остеогенной и адипогенной индуктивных средах. Вступавшие в дифференцировку в остеогенной среде клетки приобретали кубоидальную и полигональную форму и характеризовались экспрессией щелочной фосфатазы (рис. 3). Минерализация матрикса подтверждала функциональную активность остеобластов.

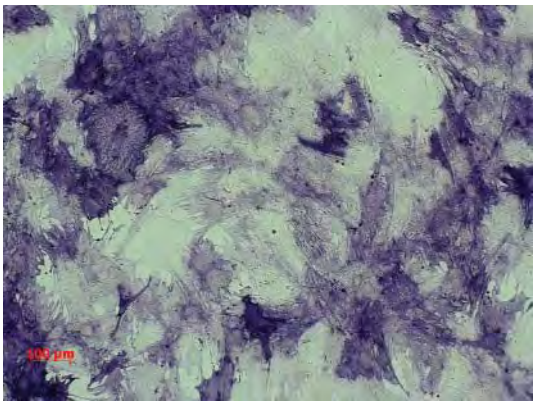

Рис. 3. **Направленная остеогенная дифференцировка МСК КМ человека *in vitro***
(окрашивание на щелочную фосфатазу)

В случае индукции адипогенеза клетки приобретали округленную форму, отмечалось формирование вакуолей и внутриклеточное накопление нейтральных жиров (рис. 4).

Формирование новых колоний МСК во время субкультивирования, способность к экспансии и наличие остеогенного и адипогенного потенциала у потомков крупных колоний свидетельствуют о том, что нами были отобраны наиболее ранние представители пула МСК, способные по крайней мере к двулинейной дифференцировке.

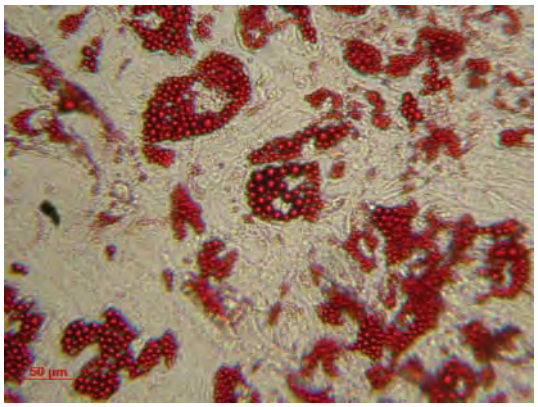

Рис. 4. **Направленная адипогенная дифференцировка МСК КМ человека *in vitro***
(окрашивание Oil Red O)

Применение смеси остеогенной и адипогенной сред при изучении дифференцировочного потенциала МСК позволяет выявлять приоритетность того или иного вида мезенхимальной дифференцировки для МСК в условиях культивирования *in vitro* [15]. В нашей работе была предпринята попытка одновременной индукции в адипо- и остеогенез МСК — потомков отдельных колоний МСК КМ человека. Как оказалось, исследованные МСК при культивировании в комбинированной смеси индуктивных сред преимущественно вступали в остеогенную дифференцировку (рис. 5).

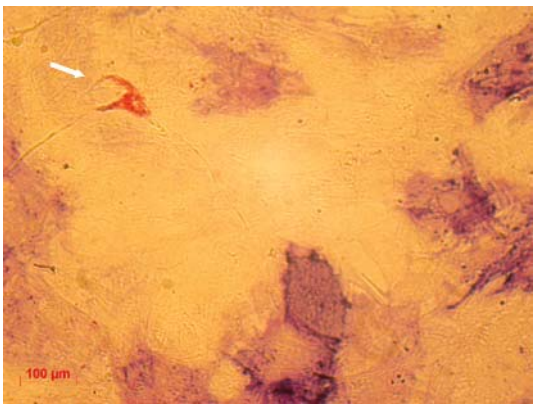

Рис. 5. **Дифференцировка МСК КМ человека, культивированных в комбинированной остео/адипогенной среде.**
Большинство клеток проявляли способность к остеогенной дифференцировке и окрашивались на щелочную фосфатазу (клетка, демонстрирующая адипогенную дифференцировку, окрашенная Oil Red O, указана стрелкой)

Эти результаты могут свидетельствовать о том, что МСК КМ предрасположены к остеогенной дифференцировке. При этом индукция

остеогенеза *in vitro* сопровождается одновременным ингибированием адипогенной дифференцировки МСК [16]. В основе этого явления лежат сложные, не до конца изученные механизмы регуляции. С другой стороны, на выбор конечной дифференцировки исследованных субпопуляций МСК преимущественно в остеогенном направлении могли повлиять применявшиеся в нашем исследовании условия культивирования (исходная посевная концентрация клеток, состав комбинированной индуктивной среды и др.). В любом случае применение такой сочетанной индукции представляется перспективным для сравнительного анализа дифференцировочных возможностей МСК, выделенных из различных тканей-источников.

Таким образом, в настоящей работе изучен иммунофенотип популяции стромальных клеток КМ человека и определены условия экспансии МСК из индивидуальных колоний. Использованный нами прием выделения колоний позволил исследовать колониеобразующие и дифференцировочные свойства клеток в пределах отдельных субпопуляций. Показана высокая способность клеток — производных крупных колоний к экспансии и индуцированной двулинейной мезенхимальной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях. Экспериментальный подход, основанный на культивировании в смеси остеогенной и адипогенной индуктивных сред, свидетельствует о преобладании остеогенной дифференцировки МСК КМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Prockop D. J.* Marrow stromal cells as stem cells for non hematopoietic tissues // Science. — 1997. — V. 276, N 5309. — P. 71–74.
2. *Le Blanc, Ringden O.* Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation // Biol. Blood Marrow Transpl. — 2005. — V. 11. — P. 321–334.
3. *Banfi A., Muraglia A., Dozin B. et al.* Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy // Exp. Hematol. — 2000. — V. 28, N 6. — P. 707–715.
4. *Bruder S. P., Jaiswal N., Haynesworth S. E.* Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation // J. Cell. Biochem. — 1997. — V. 64, N 2. — P. 278–294.
5. *Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C. et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. — 1999. — V. 284, N 5411. — P. 143–147.
6. *Baksh D., Song L., Tuan R. S.* Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy // J. Cell. Mol. Med. — 2004. — V. 8, N 3. — P. 301–316.
7. *Muraglia A., Cancedda R., Quarto R.* Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model // J. Cell. Sci. — 2000. — V. 113. — P. 1161–1168.
8. *Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Мазур С. П. и др.* Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // Трансплантология. — 2007. — Т. 6, № 1. — С. 218–220.
9. *Скоробогатова Н. Г., Волкова Н. А., Петренко А. Ю.* Остеогенные и адипогенные свойства фибробластоподобных клеток-предшественников фетальной печени человека // Цитология. — 2008. — Т. 50, № 4. — С.317–322.
10. *Кононский А. И.* Гистохимия. — К.: Вища школа, 1976. — 278 с.
11. *Kilrnan J. A.* Histological and histohemical methods. Theory and practice. Second edition. — Oxford: Pergamon Press, 1990. — 433 p.
12. *Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. — 2006. — V. 8, N 4. — P. 315–317.
13. *Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S.* The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea — pig bone marrow and spleen cells // Cell Tissue Kinet. — 1970. — V. 3, N 4. — P. 393–403.
14. *Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я.* Клеточные основы кроветворения. — М.: Медицина, 1977. — 272 с.
15. *McBeath R., Pirone D. M., Nelson C. M. et al.* Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // Dev. Cell. — 2004. — V. 6, N 4. — P. 483–495.
16. *Jaiswal R. K., Jaiswal N., Bruder S. P. et al.* Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kunase // J. Biol. Chem. — 2000. — V. 275, N 13. — P. 9645–9652.

ВИВЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ДО ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ В ОСТЕОГЕННОМУ ТА АДИПОГЕННОМУ НАПРЯМКАХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ КЛОНАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Н. Г. Скоробогатова
Ю. О. Петренко
Н. О. Волкова
О. Ю. Петренко

Інститут проблем кріобіології
та кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: skorng@mail.ru

Досліджували імунофенотип та диференціювальний потенціал мезенхімальних стромальних клітин (МСК) кісткового мозку (КМ) людини. Виділення індивідуальних колоній дозволило дослідити колонієутворюючі та диференціювальні властивості клітин у межах окремих субпопуляцій. Клітини — похідні великих колоній виявляли високу здатність до експансії та індукованого мезенхімального диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках. Під час культивування в суміші остеогенного та адипогенного індуктивних середовищ МСК КМ переважно виявляли здатність до остеогенного диференціювання.

Ключові слова: кістковий мозок, мезенхімальні стромальні клітини, диференціювання.

THE STUDY OF THE CAPABILITY TO DIFFERENTIATION IN OSTEOGENIC AND ADIPOGENIC DIRECTIONS OF HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS OF CLONAL ORIGIN

N. G. Skorobogatova
Yu. A. Petrenko
N. A. Volkova
O. Yu. Petrenko

Institute for Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kharkiv

E-mail: skorng@mail.ru

Immunophenotype and differentiation potential of mesenchymal stromal cells (MSCs) derived from bone marrow (BM) was studied. Isolation of individual colonies allowed to investigate colony-forming and differentiation capacities of the cells within single subpopulations. The cells derived from large colonies showed high ability to expansion and induced mesenchymal differentiation into osteogenic and adipogenic directions. During cultivation in a mixture of osteogenic and adipogenic inductive media BM MSCs demonstrated a predominance of osteogenic differentiation.

Key words: bone marrow, mesenchymal stromal cells, differentiation.