

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.419+618.38]-018.46

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-1-36-45>

Поступила в редакцию 30.07.2020

Received 30.07.2020

А. А. Жерносеченко, Я. И. Исайкина, Т. В. Филипович, Е. Г. Лях

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь*

ХОНДРОГЕННЫЙ И ОСТЕОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ПЛАЦЕНТЫ

Аннотация. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой перспективный ресурс для клеточных биотехнологий. Тем не менее вопрос о преимуществах использования МСК различного происхождения для хондро- и остеогенной дифференцировки требует дальнейшего изучения.

Целью данного исследования являлось проведение анализа остеохондрогенного дифференцировочного потенциала МСК, полученных из костного мозга и тканей плаценты. Результаты наших исследований свидетельствуют, что МСК как костного мозга, так и плаценты под влиянием индукционных факторов дифференцируются в хондрогенном направлении. Тем не менее реализация программы хондрогенеза в МСК костного мозга происходит преимущественно за счет экспрессии коллагенов (*Coll2*, *Coll10*), в то время как для МСК плаценты характерен более высокий синтез неколлагеновых белков внеклеточного матрикса (*COMP*, *Ver*). В связи с этим применение МСК костного мозга в инженерии хрящевой ткани более предпочтительно. Оценка синтеза щелочной фосфатазы и накопления кальциевых депозитов в дифференцированных клетках показала, что остеогенный дифференцировочный потенциал МСК костного мозга выше, чем МСК плаценты. МСК костного мозга, находясь в составе фибринового геля, дифференцируются в остеогенном направлении под влиянием индукционных факторов на 14-й день, что подтверждается синтезом щелочной фосфатазы, депонированием солей кальция внутри клетки и во внеклеточном матриксе, увеличением экспрессии мРНК *Sp7* и *DMP*.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, остеогенная дифференцировка, хондрогенная дифференцировка, фибриновый гель

Для цитирования: Хондрогенный и остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и плаценты / А. А. Жерносеченко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 1. – С. 36–45. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-1-36-45>

Hanna A. Zhernasechanka, Yanina I. Isaikina, Tatiana V. Filipovich, Elena G. Liakh

*Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus*

OSTEOGENIC AND CHONDROGENIC DIFFERENTIATION POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS OBTAINED FROM THE BONE MARROW AND PLACENTA

Abstract. Mesenchymal stem cells (MSC) represent a perspective resource for cell biotechnology. However the question of chondrogenic and osteogenic capacity of MSC of different origin remains under study.

The aim of this study was to analyze the osteo-chondrogenic differentiation potential of MSC obtained from the bone marrow and placenta. The results of our studies have indicated that bone marrow-derived and placenta-derived MSC showed a chondrogenic potential *in vitro* after a chondrogenic induction with specific differentiation media. But for bone marrow-derived MSC, the chondrogenic program was realized by expression of collagens (*Coll2*, *Coll10*), while in placenta-derived MSC cultures we found a progressive increase in *COMP* and *Ver* expression, so bone marrow-derived MSC is more preferable for use in cartilage tissue engineering. Regarding the results on alkaline phosphatase and alizarin red staining, bone marrow-derived MSC showed a more significant osteogenic potential compared to placenta-derived MSC. Bone marrow-derived MSC in the composition of fibrin gel after osteogenic induction on the 14th day exhibited the activity of alkaline phosphatase, calcium depositions inside the cells and extracellular matrix, the increase in *Sp7* and *DMP* expression.

Keywords: mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, chondrogenic differentiation, fibrin gel

For citation: Zhernasechanka H. A., Isaikina Ya. I., Filipovich T. V., Liakh E. G. Osteogenic and chondrogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells obtained from the bone marrow and placenta. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 36–45 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-1-36-45>

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) благодаря своей пластичности, иммуномодуляторным свойствам и секреции широкого спектра цитокинов и других активных молекул представляют собой перспективный ресурс для клеточных биотехнологий [1]. На сегодняшний день разработаны протоколы получения МСК из различных источников, в частности из костного мозга, жировой ткани, плаценты, пуповинной крови, пульпы зуба, кожи и подкожной клетчатки, слюнных желез, менструальной крови, периферической крови и т. д. [2].

Для унификации характеристик МСК, полученных в разных лабораториях, и облегчения обмена данными между исследователями Международное общество клеточной терапии (The International Society for Cellular Therapy (ISCT)) в 2006 г. предложило минимальные критерии для установления принадлежности клеток к МСК: наличие адгезивных свойств в стандартных условиях культивирования; экспрессия поверхностных молекул CD105, CD73 и CD90 и отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79alpha или CD19 и HLA-DR; способность к дифференцировке в osteo-, адипо- и хондрогенном направлении *in vitro* [3]. Несмотря на соответствие МСК вышеупомянутым критериям, клетки, полученные из различных источников, имеют специфические особенности.

Наиболее изученными являются МСК, выделенные из костного мозга (КМ-МСК) и жировой ткани. Тем не менее для выделения популяции данных клеток требуются инвазивные процедуры. Альтернативным источником МСК могут являться ткани послеродовой плаценты (П-МСК). П-МСК обладают рядом преимуществ: более высоким пролиферативным потенциалом, экспрессией плюрипотентных маркеров, отсутствием эффектов старения на ранних пассажах культивирования, которые наблюдаются в МСК из тканей взрослого организма. Кроме того, отсутствие этических ограничений и доступность материала послеродовой плаценты открыли новые возможности для развития терапии стволовыми клетками [1].

Применению МСК, полученных из костного мозга и тканей плаценты, для регенерации хрящевой и костной ткани посвящено много экспериментальных и клинических исследований, результаты которых подтвердили эффективность этого метода клеточной терапии, однако нет единого мнения о преимуществе использования МСК из того или иного источника. J. S. Neo с соавт. [4] в своем исследовании потенциала дифференцировки в хондро- и остеогенном направлении и иммуномодулирующего эффекта показали, что МСК костного мозга и жировой ткани представляют собой более оптимальный источник стволовых клеток для тканевой инженерии, чем МСК плаценты и пуповинной крови. M. E. Bernardo с соавт. [5] в своей экспериментальной работе продемонстрировали, что КМ-МСК обладают более высокой способностью к хондрогенной дифференцировке, чем П-МСК.

С другой стороны, S. Hsu с соавт. [6] придерживаются противоположного мнения, утверждая, что для тканевой инженерии хрящевой ткани более предпочтительно применение П-МСК, чем КМ-МСК. N. Veeravolu с соавт. [7], используя молекулярно-генетический метод для оценки интенсивности osteo- и хондрогенной дифференцировки МСК, выделенных из различных тканей, показали, что в случае остеогенной дифференцировки МСК, выделенные из области соединения плаценты с пуповиной, демонстрируют более интенсивную экспрессию генов коллагена I типа, остеооптина и остеокальцина, а при хондрогенной дифференцировке – более высокую экспрессию генов хондрогенеза *Sox9* и *Coll2* по сравнению с КМ-МСК.

Таким образом, вопрос о преимуществах использования МСК различного происхождения для хондрогенной и остеогенной дифференцировки для репарации хрящевой и костной ткани требует дальнейшего изучения.

Цель данного исследования – проведение анализа osteохондрогенного дифференцировочного потенциала мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга и ткани плаценты.

Материалы и методы исследования. *Получение КМ-МСК.* Для получения МСК мононуклеарные клетки выделяли из проб костного мозга на Гистопаке плотностью 1,077 г/мл (Sigma, США), отмывали в 0,9 %-ном NaCl, ресуспендировали в IMDM с 10 %-ной эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Sigma, США) и переносили в концентрации $(2-3) \cdot 10^6$ /мл во флакон T25 (Sarstedt, Германия).

Получение П-МСК. Для выделения МСК из ткани плаценты использовали ферментативный способ. Фрагменты тканей плаценты смешивали с 0,14 %-ным раствором коллагеназы I (Stem Cell Technologies, Канада) в соотношении 1:1, инкубировали 30 мин при 37 °С с последующей инактивацией фермента 10 %-ной ЭТС (Sigma, США). Полученные клетки культивировали в среде IMDM (Life Technologies, США) с 10 %-ной ЭТС МСК (Sigma, США) и антибиотиком-антимикотиком (Life Technologies, США).

КМ-МСК и П-МСК инкубировали при +37 °С и 5 % CO₂. Смена среды каждые 3–4 дня. При получении 80–90 % конфлюэнтного слоя МСК дезадгезировали 0,25 %-ным трипсином-ЭДТА (Sigma, США), отмывали в 0,9 %-ном NaCl и переносили во флаконы T75 в количестве 0,5·10⁶ для экспансии.

Хондрогенная дифференцировка МСК в пеллете. Для хондрогенной дифференцировки в 3D системе (пеллете) МСК переносили в дифференцировочную среду: DMEM с 10 нг/мл TGFβ3 (Life technologies, США), 100 нг/мл IGF1, 10⁻⁷ М дексаметазона, 1 % антибиотика, центрифугировали при 250 g в течение 5 мин и культивировали в течение 21 дня, меняя среду каждые 3–4 дня. Гистологическое окрашивание срезов клеточных пеллетов после хондродифференцировки красителем толуидиновым синим проводили для оценки синтеза клетками гликозаминогликонов внеклеточного матрикса.

Остеогенная дифференцировка МСК в монослое. Для проведения эксперимента по остеогенной дифференцировке МСК, полученные из костного мозга и плаценты, помещали в 4-луночный планшет по 2,5·10⁵/лунку в среду DMEM с 10 %-ной ЭТС в двух вариантах: с добавлением 10 мМ глицерол-2-фостата, 1 % антибиотика, 50 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты, 10 нг/мл BMP-2, 100 нМ дексаметазона и без факторов дифференцировки (контроль). МСК культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5 % CO₂ и 90 %-ной влажности, меняя среду каждые 3–4 дня. Кроме того, для П-МСК в качестве индукции остеогенной дифференцировки использовали кондиционную среду от дифференцирующихся КМ-МСК.

Остеодифференцировка в 3D системе. МСК культивировали в среде DMEM с добавлением факторов для остеогенной дифференцировки. В качестве носителя применяли фибриновый гель. МСК в фибриновом геле получали путем смешивания суспензии клеток с 0,01 г фибриногена, растворенного в 1 мл 0,9 %-ного водного раствора хлорида натрия с добавлением 100 мкл апротенина, и последующего добавления 10 IU тромбина, разведенного в 1 мл 0,9 %-ного водного раствора хлорида натрия. Носитель помещали в лунку 24-луночного планшета совместно с 1·10⁶ МСК в 1 мл дифференцировочной среды. Планшет помещали в CO₂-инкубатор при 37 °С, 5 % CO₂ и 90 %-ной влажности. Культивирование проводили в течение 14 дней, меняя среду каждые 3–4 дня.

Для подтверждения направленной остеогенной дифференцировки клетки окрашивали, используя для оценки активности щелочной фосфатазы набор Fast Blue RR Salt, Naphtol AS MX Phosphate Alkaline Solution (Sigma, США) согласно инструкции. Присутствие в клетках кальциевых депозитов подтверждали путем окраски 2 %-ным раствором ализаринового красного (рН 4,1) в течение 45 мин после фиксации (30 мин) в 10 %-ном растворе формальдегида.

Методом количественной ПЦР в реальном времени определяли экспрессию генов *Runx2*, *Sp7*, *DMP*, *Coll2*, *Coll1*, *Coll10*, *COMP*, *Ver*. Методом обратной транскрипции проводили синтез комплементарных цепочек ДНК, используя в качестве матрицы выделенную РНК, для чего 1 мкг РНК в концентрации 0,1 мкг/1 мкл воды денатурировали в течение 10 мин при 700 °С. Затем аликвоту РНК, охлажденную на льду, вносили в смесь для обратной транскрипции (4 мкл 5-кратного буфера для обратной транскриптазы (Promega, США), 2 мкл 10 мМ смеси дезнуклеотидтрифосфатов, 1 мкл 500 мМ случайных праймеров (рэндом гексамеров) (Invitrogen, США), 0,5 мкл ингибитора рибонуклеаз в концентрации 40 Ед/мкл, 1 мкл 200 Ед/мкл обратной транскриптазы MMLV (Promega, США) и 1,5 мкл воды) и инкубировали, используя программу: 20 °С – 10 мин, 42 °С – 45 мин, 99 °С – 3 мин. Разводили кДНК водой до конечного объема 50 мкл. В работе использовали праймеры к исследуемым генам. В качестве контрольного гена использовали ген *ABL* (альбумин). Значение экспрессии генов рассчитывали как соотношение экспрессии интересующих генов и контрольного гена. В качестве флуоресцентного красителя применяли

SYBR Green. Для приготовления реакционной смеси использовали набор QuantiTect SYBR Green PCR Kits (QIAGEN). ПЦР проводили как однокомпонентную реакцию (в каждой пробирке праймеры к одной мишени). Условия проведения реакции были следующими: при 500 °С – 2 мин, при 950 °С – 15 мин, при 940 °С – 15 с, при 600 °С – 30 с, при 720 °С – 30 с. Анализ специфичности амплификации проверяли по кривым плавления.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 6 (StatSoft, США) и включала методы описательной статистики с определением медианы, 25-го и 75-го перцентилей и методы анализа для непараметрического распределения: достоверность различий между независимыми выборками оценивали с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, а для сравнения связанных выборок – критерий Уилкоксона. Зависимость между показателями определяли с помощью коэффициента корреляции Спирмана (Spearman Rank Order Correlations). При уровне значимости $p < 0,05$ различия показателей считали достоверными.

Результаты и их обсуждение. *Хондрогенная дифференцировка КМ-МСК и П-МСК в пеллетной культуре.* Было проведено культивирование МСК в присутствии факторов хондрогенной дифференцировки в пеллетной культуре в течение 21 дня. Анализ продукции компонентов внеклеточного матрикса хрящевой ткани показал, что КМ-МСК и П-МСК на 21-й день синтезируют протеогликаны, что подтверждалось положительной окраской толуидиновым синим (рис. 1, *b, d*), причем интенсивное фиолетовое окрашивание свидетельствовало о более высоком синтезе кислых мукополисахаридов в клетках, полученных при хондродифференцировке П-МСК (рис. 1, *d*).

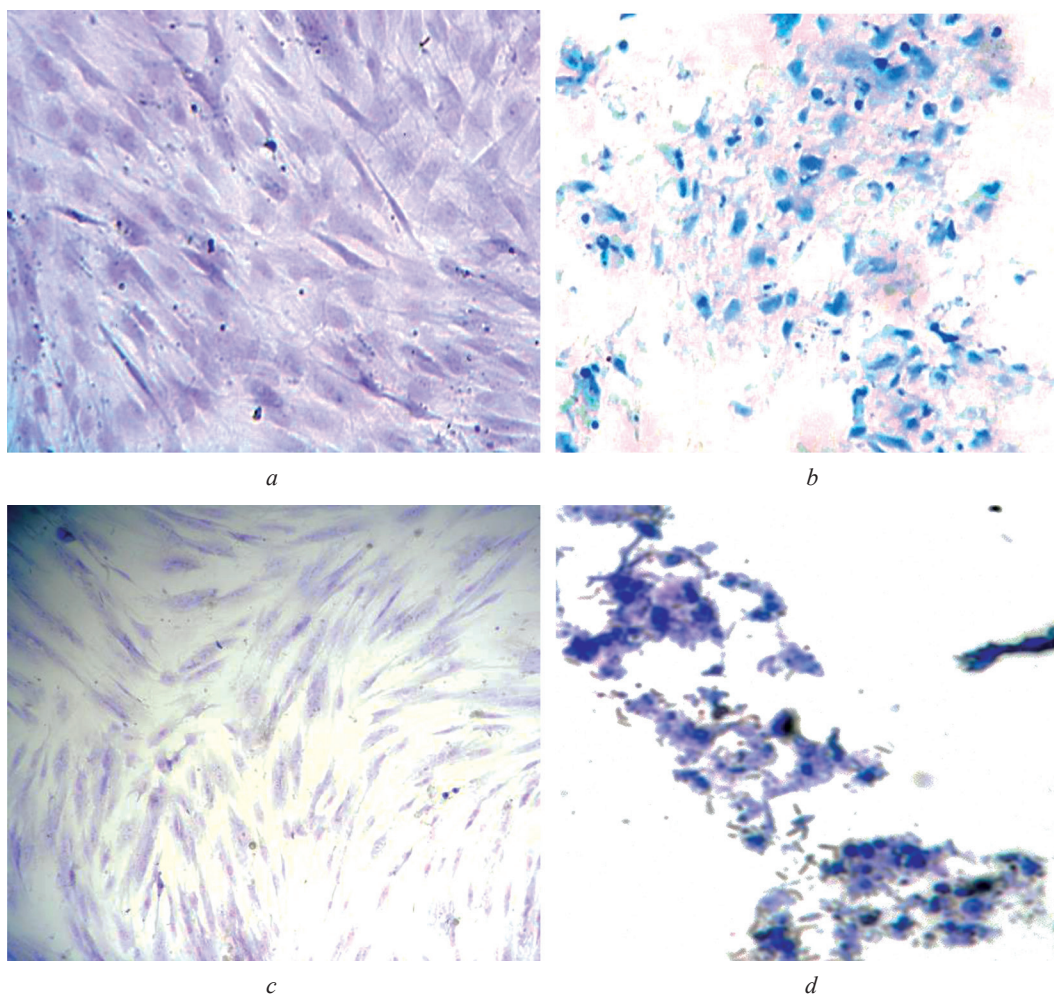


Рис. 1. Окраска культуры толуидиновым синим до дифференцировки КМ-МСК (*a*), П-МСК (*c*) и после 21 дня хондродифференцировки КМ-МСК (*b*), П-МСК (*d*). $\times 400$

Fig. 1. Toluidine blue staining of before differentiation BM-MSC (*a*), P- MSC (*c*) and pellet after 21 days of chondrodifferentiation of BM-MSC (*b*), P-MSC (*d*). $\times 400$

Анализ основных хондрогенных маркеров методом ПЦР после 7 дней направленной индукции показал, что среди генов, отвечающих за синтез коллагенов, экспрессия *Coll2* в 18 раз, а *Coll10* – в 4 раза выше в преддифференцированных КМ-МСК, чем в П-МСК ($p < 0,05$) (табл. 1), т. е. в КМ-МСК идет более интенсивный синтез коллагена II и X типов. Последнее согласуется с данными М. Е. Bernardo с соавт. [5], которые с использованием метода иммуногистохимии установили, что пробы КМ-МСК после хондродифференцировки дают положительную окраску на коллаген X, в отличие от П-МСК, на основании чего авторы сделали заключение, что только КМ-МСК способны дойти до терминальной фазы дифференцировки. Но, так как экспрессия гена *Coll10* свидетельствует о гипертрофии получаемых *in vitro* хондроцитоподобных клеток, то высокая активность этого гена может рассматриваться нами как негативный момент хондродифференцировки МСК. Достоверных различий в экспрессии гена *Coll1* между КМ-МСК и П-МСК не наблюдалось.

Таблица 1. Экспрессия генов в КМ-МСК и П-МСК на 7-й день хондродифференцировки

Table 1. Gene expression profiles in BM-MSK and P-MSK after 7 days of chondrogenic differentiation

Ген	Уровень экспрессии, Me (25 %–75 %)	
	КМ-МСК ($n = 16$)	П-МСК ($n = 12$)
<i>Coll2</i>	18,57 (2,69–93,38)	1,00 (0,30–2,87)*
<i>Coll1</i>	0,08 (0,02–0,10)	0,04 (0,02–0,13)
<i>Coll10</i>	2,31 (0,51–3,71)	0,56 (0,18–0,63)*
<i>COMP</i>	0,31 (0,11–0,84)	1,85 (1,03–2,93)*
<i>Ver</i>	0,16 (0,05–0,19)	0,33 (0,21–0,76)*

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – достоверность различий ($p < 0,05$).

которой более интенсивный синтез протеогликанов препятствует наработке коллагенов, а чрезмерное количество протеогликанов увеличивает нагрузку на фибриллярную сеть коллагенов, отрицательно влияя на растяжимость ткани.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что реализация хондрогенной программы в КМ-МСК происходит главным образом за счет экспрессии коллагенов (*Coll2*, *Coll10*), в то время как для П-МСК характерен более высокий потенциал в индукции синтеза неколлагенных белков внеклеточного матрикса, кодируемых генами *COMP* и *Ver*, в связи с чем применение КМ-МСК в инженерии хрящевой ткани рассматривается нами как более предпочтительный источник МСК.

Остеогенная дифференцировка КМ-МСК и П-МСК в 2D системе. Воздействие факторов индукции остеогенеза в течение 21 дня на КМ-МСК ($n = 6$) и П-МСК ($n = 12$) в монослойной культуре привело к изменению морфологии большинства клеток КМ-МСК, которые утрачивали характерную для МСК веретенообразную форму и трансформировались в широкие, распластаные клетки, подобные остеобластам, и плоские клетки с большим числом контактирующих отростков, подобные остеоцитам. В культуре П-МСК морфология, характерная для дифферона остеоицита, наблюдалась только у отдельных клеток. Сравнительная оценка синтеза щелочной фосфатазы методом гистохимического окрашивания показала, что продукция данного компонента матрикса при остеодифференцировке КМ-МСК значительно выше (рис. 2, *b, c*), чем при остеодифференцировке П-МСК (рис. 2, *e, f*).

Гистохимическая окраска ализариновым красным КМ-МСК (рис. 3, *a, b*) и П-МСК (рис. 3, *c, d, e*) подтвердила наличие в клетках после остеогенной дифференцировки депонированных солей кальция, которые отсутствовали в контроле (рис. 3, *a, c*). При этом кальциевые депозиты в дифференцированных П-МСК (рис. 3, *d*) отмечены в значительно меньшем количестве, чем в КМ-МСК (рис. 3, *b*).

Проведенная нами индукция остеогенеза в П-МСК путем добавления к клеткам кондиционной среды от дифференцирующихся КМ-МСК привела к интенсивному накоплению солей кальция в остеодифференцированных П-МСК (рис. 3, *e*).

Проведено сравнение экспрессии генов, кодирующих неколлагеновые белки матрикса хрящевой ткани: *COMP*, отвечающего за синтез олигомерного матриксного белка хряща, который связывает между собой коллагеновые волокна, а также *Ver* – гена версикана из семейства агреканов. Анализ показал, что экспрессия *COMP* более чем в 6 раз и *Ver* в 2 раза выше в преддифференцированных П-МСК, чем в КМ-МСК ($p < 0,05$) (табл. 1).

Считается, что основным недостатком при создании биоинженерного хряща является низкое содержание коллагенов. L. Kosk с соавт. [8] выдвинули гипотезу, согласно ко-

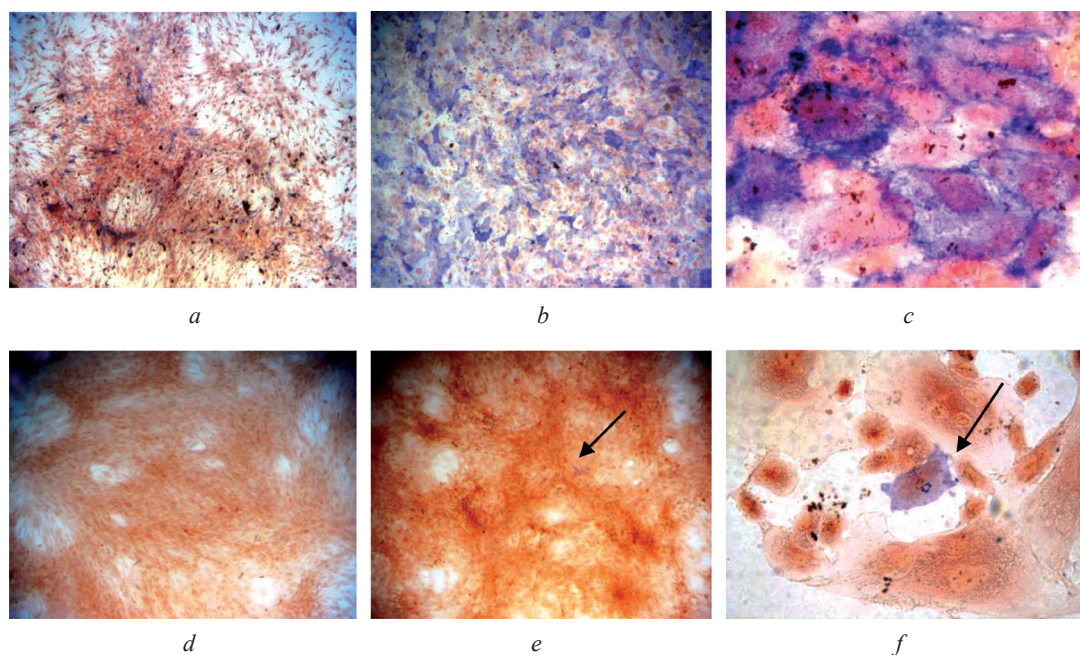


Рис. 2. Окраска культуры на щелочную фосфатазу до дифференцировки КМ-МСК (а), П-МСК (d) и после остеодифференцировки КМ-МСК (b, c), П-МСК (e, f). $\times 40$ (a, b, d, e), $\times 400$ (c, f)

Fig. 2. Staining with alkaline phosphatase histochemistry before differentiation BM-MSC (a), P-MSC (d) and after osteogenic differentiation BM-MSC (b, c), P-MSC (e, f). $\times 40$ (a, b, d, e), $\times 400$ (c, f)

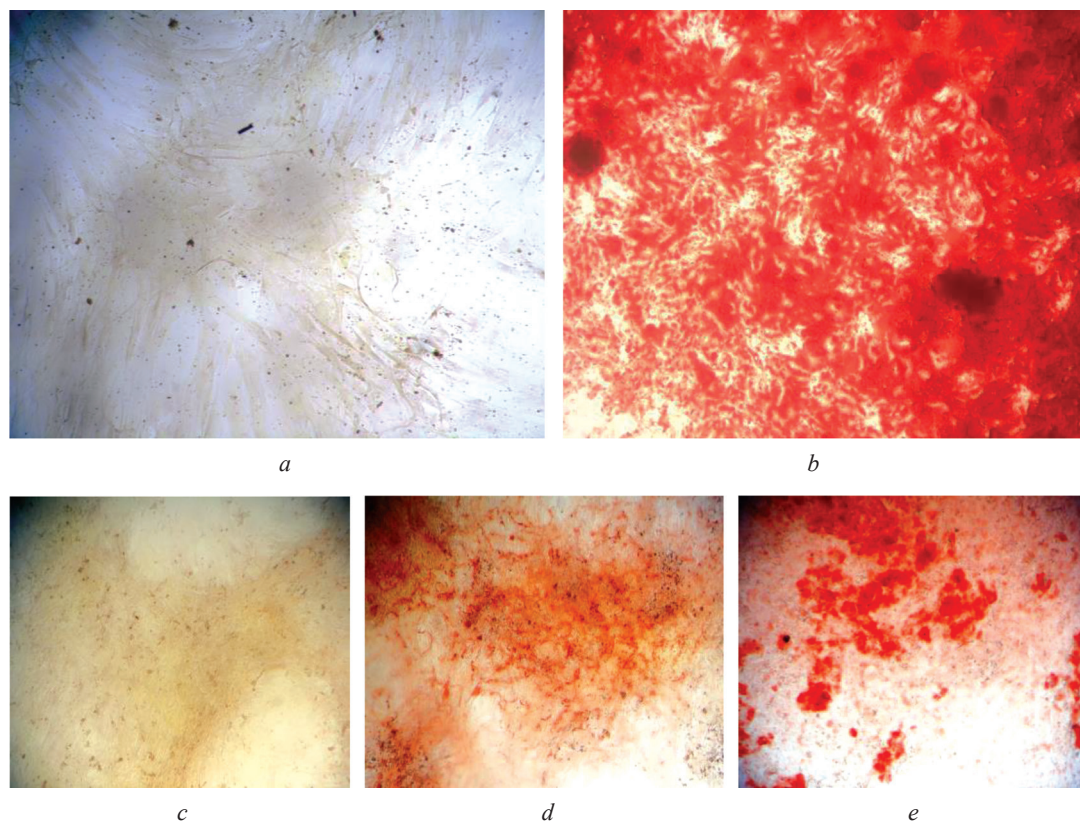


Рис. 3. Окраска культуры ализариновым красным до дифференцировки КМ-МСК (а), П-МСК (c) и после остеодифференцировки КМ-МСК (b), П-МСК (d, e), П-МСК в кондиционной среде (e). $\times 40$

Fig. 3. Alizarin red staining before differentiation BM-MSC (a), P-MSC (c) and after osteogenic differentiation BM-MSC (b), P-MSC (d, e), P-MSC – in conditioned media from differentiating BM-MSC (e). $\times 40$

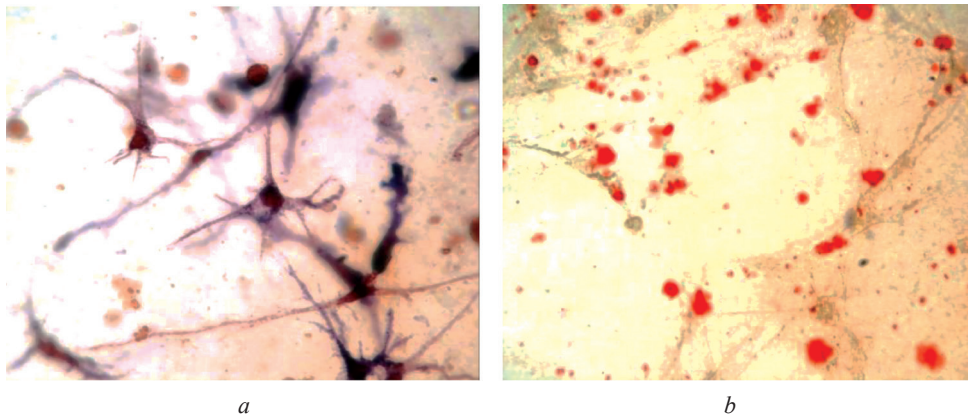


Рис. 4. МСК в фибриновом геле на 14-й день остеодифференцировки: окраска на щелочную фосфатазу (а), окраска солей кальция ализариновым красным (b). $\times 400$

Fig. 4. Osteogenic differentiation BM-MSC in fibrin gel for 14 days: alkaline phosphatase staining (a), alizarin red staining (b). $\times 400$

Экспериментальные исследования дифферона МСК костного мозга показали, что существуют коммитированные клетки с различным набором потенциалов и что, согласно иерархической модели, предложенной А. Muraglia с соавт. [9], ранние предшественники МСК костного мозга, обладающие потенциалом к дифференцировке в трех направлениях – остео-, хондро- и адипогенном, впоследствии теряют способность сначала к адипогенной, а затем и к хондрогенной дифференцировке. В конечном счете все МСК стромы обладают остеогенным потенциалом, 60–80 % клеток являются коммитированными в остео- и хондрогенном направлении, и только 30 % составляют трипотентные предшественники. Причем само микроокружение стромы костного мозга способствует сохранению МСК с остео- и хондрогенным дифференцировочным потенциалом [10]. В первичной культуре МСК остеогенно коммитированные клетки имеют повышенную активность щелочной фосфатазы и отличаются более крупным размером и сниженным пролиферативным потенциалом [11]. Это объясняет повышенную чувствительность к остеодифференцировочным агентам КМ-МСК по сравнению с П-МСК, которые содержат меньшее количество остеопрогениторных клеток.

Остеогенная дифференцировка МСК КМ-МСК в 3D системе. С целью оценки возможности остеоиндукции КМ-МСК в 3D системе нами был проведен эксперимент по заселению клеток в фибриновый гель с последующей их дифференцировкой в течение 14 дней. Через 2 ч после внесения клеток в гель наблюдалось относительно равномерное их распределение в носителе. Уже в первые 24 ч отмечалось наличие клеток с отростками, т. е. изменялась морфология МСК, а на 14-й день после направленной дифференцировки – наличие клеток с выраженными отростками, которые синтезировали щелочную фосфатазу (рис. 4, а) и характеризовались накоплением солей кальция, депозиты которого присутствовали как внутри-, так и внеклеточно (рис. 4, b).

В табл. 2 представлены данные, полученные методом количественной ПЦР в реальном времени. Нами было выявлено достоверное увеличение (в 6 раз) экспрессии мРНК *DMP* (матричный белок дентина) по отношению к контролю ($p < 0,05$). Данный ген является маркером начала ми-

Таблица 2. Экспрессия генов остеодифференцировки КМ-МСК в 3D системе ($n = 13$)

Table 2. Expression level of osteogenic differentiation-related genes in BM-MSC in 3D ($n = 13$)

Ген	Уровень экспрессии, Me (25 %–75 %)	
	до дифференцировки	после остеодифференцировки
<i>DMP</i>	0,004 (0,001–0,02)	0,06 (0,02–0,13)*
<i>Sp7</i>	0,01 (0,002–0,05)	0,04 (0,02–0,13)
<i>Runx2</i>	0,3 (0,24–0,53)	0,11 (0,04–0,25)

нерализации матрикса. Одноименный белок представляет собой кислый фосфопротеин, который играет важную роль в инициации минерализации ткани и является специфичным белком для внеклеточного матрикса костей и зубов [12]. В 95 % случаев отмечалось увеличение экспрессии гена *Sp7*, который стимулирует экспрессию генов коллагена типа I, костного сиалопротеина, остеопонтинина, остео-нектинина, остеокальцина, в 4 раза ($p < 0,05$) [13].

Также нами установлена положительная корреляция между экспрессией *Sp7* и *DMP* на 0-й день ($R = 0,7$) и на 14-й день дифференцировки ($R = 0,7$) ($p < 0,05$).

Следует отметить отсутствие достоверных изменений в экспрессии транскрипционного фактора *Runx2* после 14 дней остеодифференцировки МСК в нашем исследовании. *Runx2* является регулятором реализации программы дифференцировки МСК в остеобластоподобные клетки. В начальной фазе дифференцировки отмечается высокий уровень *Runx2*, а на поздних стадиях, начиная со стадии зрелых остеобластов, его уровень постепенно снижается до полного отсутствия у остеоцитов [14, 15].

Таким образом, КМ-МСК под влиянием индукционных факторов на 14-й день дифференцировались в остеогенном направлении в 3D системе фибринового геля, что подтверждалось изменением морфологии клеток, синтезом щелочной фосфатазы, депонированием солей кальция внутри и внеклеточно, увеличением экспрессии мРНК *Sp7* и маркера начала минерализации *DMP*.

Заключение. Результаты наших исследований показали, что МСК как костного мозга, так и плаценты под влиянием индукционных факторов дифференцируются в хондрогенном направлении, но реализация программы хондрогенеза в МСК костного мозга происходит преимущественно за счет экспрессии коллагенов (*Coll2*, *Coll10*), в то время как для МСК плаценты характерен более высокий синтез неколлагеновых белков внеклеточного матрикса, кодируемых генами *COMP* и *Ver*. В связи с этим применение МСК костного мозга в инженерии хрящевой ткани более предпочтительно.

Остеогенный дифференцировочный потенциал МСК костного мозга выше, чем МСК плаценты, что подтверждается активным синтезом щелочной фосфатазы и накоплением кальциевых депозитов в дифференцированных МСК. Однако следует отметить, что применение кондиционной среды, полученной при остеодифференцировке МСК костного мозга, значительно активизирует остеогенез в МСК плаценты при культивировании.

МСК костного мозга в составе фибринового геля дифференцируются в остеогенном направлении под влиянием индукционных факторов уже на 14-й день, что подтверждается изменением морфологии клеток, синтезом щелочной фосфатазы, депонированием солей кальция внутри клетки и во внеклеточном матриксе, увеличением экспрессии мРНК *Sp7* и маркера начала минерализации *DMP*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and cord blood mesenchymal stromal/stem cells for cartilage regeneration / R. Rakic [et al.] // *Sci. Reports*. – 2018. – Vol. 88. – Art. 13799. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28164-9>
2. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells // D. Mushahary [et al.] / *Cytometry. Part A*. – 2018. – Vol 93, N 1. – P. 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
3. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // *Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8, N 4. – P. 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
4. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue / J. S. Heo [et al.] // *Int. J. Mol. Med*. – 2016. – Vol. 37, N 1. – P. 115–125. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2413>
5. Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources / M. E. Bernardo [et al.] // *J. Connect. Tissue Res*. – 2007. – Vol. 48, N 3. – P. 132–140. <https://doi.org/10.1080/03008200701228464>
6. Chondrogenesis from human placenta-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional scaffolds for cartilage tissue engineering / S. Hsu [et al.] // *Tissue Eng. Part A*. – 2011. – Vol. 17, N 11–12. – P. 1549–1560. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0419>
7. Isolation and comparative analysis of potential stem/progenitor cells from different regions of human umbilical cord / N. Beeravolu [et al.] // *Stem Cell Res*. – 2016. – Vol. 16, N 3. – P. 696–711. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.04.010>
8. Kock, L. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status / L. Kock, C. C. van Donkelaar, K. Ito // *Cell Tissue Res*. – 2012. – Vol. 347, N 3. – P. 613–627. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1243-1>
9. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model / A. Muraglia [et al.] // *J. Cell Sci*. – 2000. – Vol. 113. – Pt. 7. – P. 1161–1166.

10. *In vitro* high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment / K. C. Russell [et al.] // *Stem Cells*. – 2010. – Vol. 28, N 4. – P. 788–798. <https://doi.org/10.1002/stem.312>
11. Characterization of different subpopulations from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by alkaline phosphatase expression / Y. H. Kim [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2012. – Vol 21, N 16. – P. 2958–2968. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0349>
12. Dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in developing human teeth / E. F. Martinez [et al.] // *Brazilian Dent. J.* – 2009. – Vol. 20, N 5. – P. 365–369. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402009000500002>
13. Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и ее регуляция / Ф. Х. Камиллов [и др.] // *Фунд. исслед.* – 2014. – № 7-4. – С. 836–842.
14. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells from basic knowledge, animal models to clinical trials / G. Hutchings [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2020. – Vol. 9, N 1. – pii E139. <https://doi.org/10.3390/jcm9010139>
15. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation / M. Lee [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 1999. – Vol. 73, N 1. – P. 114–125. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(19990401\)73:1<114::aid-jcb13>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(19990401)73:1<114::aid-jcb13>3.0.co;2-m)

References

1. Rakic R., Bourdon B., Demoor M., Maddens St., Saulnier N., Galéra Ph. Differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and cord blood mesenchymal stromal/stem cells for cartilage regeneration. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, art. 13799. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28164-9>
2. Mushahary D., Spittler A., Kasper C., Weber V., Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry. Part A*, 2018, vol. 93, no. 1, pp. 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
3. Dominici M., le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Krause D. S., Deans R. J., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, vol. 8, no. 4, pp. 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
4. Heo J. S., Choi Y., Kim H. S., Kim H. O. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International Journal of Molecular Medicine*, 2016, vol. 37, no. 1, pp. 115–125. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2413>
5. Bernardo M. E., Emons J. A. M., Karperien M., Nauta A. J., Willemze R., Roelofs H. [et al.]. Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources. *Journal Connective Tissue Research*, 2007, vol. 48, no. 3, pp. 132–140. <https://doi.org/10.1080/03008200701228464>
6. Hsu Sh., Huang T., Cheng Sh., Weng S. Y., Tsai Ch. L., Tseng Ch. Sh., Chen D. Ch., Liu T. Y., Fu K. Y., Yen B. L. Chondrogenesis from human placenta-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering. Part A*, 2011, vol. 17, no. 11–12, pp. 1549–1560. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0419>
7. Beeravolu N., Khan I., McKee C., Dinda S., Thibodeau B., Wilson G., Perez-Cruet M., Bahado-Singh R., Chaudhry G. R. Isolation and comparative analysis of potential stem/progenitor cells from different regions of human umbilical cord. *Stem Cell Research*, 2016, vol. 16, no. 3, pp. 696–711. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.04.010>
8. Kock L., van Donkelaar C. C., Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell and Tissue Research*, 2012, vol. 347, no. 3, pp. 613–627. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1243-1>
9. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 2000, vol. 113, pt. 7, pp. 1161–1166.
10. Russell K. C., Phinney D. G., Lacey M. R., Barrilleaux B. L., Meyertholen K. E., O'Connor K. C. *In vitro* high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*, 2010, vol. 28, no. 4, pp. 788–798. <https://doi.org/10.1002/stem.312>
11. Kim Y. H., Yoon D. S., Kim H. O., Lee J. W. Characterization of different subpopulations from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by alkaline phosphatase expression. *Stem Cells and Development*, 2012, vol. 21, no. 16, pp. 2958–2968. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0349>
12. Martinez E. F., Herdy da Silva L. A., Furuse Cr., Soares de Araújo N., Cavalcanti de Araújo V. Dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in developing human teeth. *Brazilian Dental Journal*, 2009, vol. 20, no. 5, pp. 365–369. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402009000500002>
13. Kamilov F. Kh., Farshatova E. R., Enikeev D. A. Cell-molecular mechanisms of bone tissue remodeling and its regulation. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental research], 2014, no. 7-4, pp. 836–842 (in Russian).
14. Hutchings G., Moncrieff L., Dompe C., Janowicz K., Sibiak R., Bryja A. [et al.]. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells from basic knowledge, animal models to clinical trials. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, vol. 9, no. 1, pii E139. <https://doi.org/10.3390/jcm9010139>
15. Lee M. H., Javed A., Kim H. J., Shin H. I., Gutierrez S., Choi J. Y. [et al.]. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1999, vol. 73, no. 1, pp. 114–125. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(19990401\)73:1<114::aid-jcb13>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(19990401)73:1<114::aid-jcb13>3.0.co;2-m)

Информация об авторах

Жерносеченко Анна Александровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: sapphire.anna@gmail.com

Исайкина Янина Ивановна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: yaninai@mail.ru

Филипович Татьяна Валерьевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: tatianafilipovich95@gmail.com

Лях Елена Геннадьевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: lyakhelena@gmail.com

Information about the authors

Hanna A. Zhernasechanka – Researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: sapphire.anna@gmail.com

Yanina I. Isaikina – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: yaninai@mail.ru

Tatiana V. Filipovich – Junior Researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: tatianafilipovich95@gmail.com

Elena G. Liakh – Researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: lyakhelena@gmail.com