

ОСОБЕННОСТИ ИНДУКЦИИ ОСТЕОДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК АДИПОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ *in vitro*

© 2022 г. Н. М. Александрова¹, А. М. Аймалетдинов¹, А. Г. Маланьева¹,
М. А. Тамбовский^{1, *}, А. А. Ризванов^{1, 2}, Е. Ю. Закирова^{1, **}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

²Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения
Республики Татарстан, Казань, 420064 Россия

*e-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com

**e-mail: lenahamzina@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.04.2022 г.

После доработки 14.06.2022 г.

Принята к публикации 17.06.2022 г.

Исследованы особенности прохождения дифференцировки в остеонаправлении нативных и генетически модифицированных мезенхимных стволовых клеток (МСК) собаки в различных дифференцировочных средах. Показано, что за 21 сутки культивирования МСК в коммерческой индукционной среде происходит отложение кальция во внеклеточный матрикс. Применение для остеодифференцировки среды на основе α -МЕМ, в состав которой входят остеоиндуцирующие компоненты, также индуцировало дифференцировку МСК, но отложение кальция шло менее активно. Генная модификация МСК собаки плазмидной ДНК, содержащей видоспецифичный ген костного морфогенетического белка-2 (*BMP2*) собаки (*Canis familiaris*), стимулировала синтез щелочной фосфатазы, но не вызывала отложения кальция во внеклеточном матриксе. Таким образом, для образования остеоцитов из МСК собаки в условиях *in vitro* недостаточно влияния только эндогенного фактора – сверхэкспрессии *BMP2*, – необходимо действие экзогенных факторов, индуцирующих остеогенез. К ним относится дексаметазон в комбинации с L-аскорбиновой кислотой (витамин С) и β -глицерофосфатом. Следовательно, для проведения полноценной остеодифференцировки МСК собаки *in vitro* следует использовать комплекс остеоиндуцирующих компонентов.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, остеодифференцировка, костный морфогенетический белок

DOI: 10.56304/S0234275822040032

В настоящее время термин мезенхимные стволовые клетки (МСК) обозначает клоногенные полипотентные клетки-предшественники, способные к адгезии на пластике и дифференцировке *in vitro* во все элементы стромального микроокружения, а также обладающие определенным иммунофенотипом. Источником МСК могут служить костный мозг, эмбриональная и жировая ткань (ЖТ), печень и т.д. При культивировании в отсутствие индукторов дифференцировки МСК образуют слой фибробластоподобных клеток. Их форма разнообразна и может быть веретеновидной или звездчатой. При анализе профиля экспрессии генов показано наличие в МСК транскриптов, характерных для эпителия, эндотелия, нервной ткани, остеобластов, хондроцитов, адипоцитов, миобластов, а также для стромы

костного мозга. МСК обладают остеогенным, адипогенным и хондрогенным потенциалом [1].

Для стимуляции остеогенной дифференцировки МСК *in vitro* используют специально разработанные среды, в состав которых входят отдельные остеоиндуктивные компоненты, такие как дексаметазон, аскорбиновая кислота, β -глицерофосфат, костные морфогенетические белки (Bone Morphogenetic Proteins, BMP) и другие вещества [2]. Изначально BMP были описаны как молекулы, стимулирующие формирование эндохондриальной костной ткани. Позднее было показано, что BMP могут регулировать разнообразные клеточные процессы, которые включают пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, хемотаксис, ангиогенез и продукцию внеклеточного матрикса во многих клетках и тканях [3].

Согласно современным данным, наиболее эффективным остеоиндуктивным фактором роста, стимулирующим пролиферацию и дифференци-

Сокращения: ЖТ – жировая ткань; МСК – мезенхимные стволовые клетки; ЩФ – щелочная фосфатаза; BMP (bone morphogenetic protein) – костный морфогенетический белок.

ровку остеогенных клеток, является BMP-2 [4]. Механизм его действия заключается в стимуляции сигнальных путей МСК путем активации трансмембранных рецепторов типа I и типа II [5]. Однако к существенным недостаткам при использовании этого белка относится короткий период полураспада и быстрая деградация [6]. В связи с этим для стимуляции остеогенеза МСК, как *in vitro*, так и *in vivo*, клетки модифицируют генами, кодирующими BMP. В результате увеличивается период воздействия целевого белка на клетки [7–9].

Известно, что использование очищенных рекомбинантных белков фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) и BMP на животных моделях экспериментальных переломов стимулирует регенерацию костной ткани и ускоряет процесс заживления костей, причем эффективнее, чем при применении только BMP [10]. Ранее нами была получена плазмидная конструкция, содержащая гены *BMP2* и *VEGF164* собаки, и показана ее биологическая активность как *in vitro*, так и *in vivo* [11, 12].

Целью представленной работы было изучение эффективности прохождения дифференцировки в остеогенном направлении МСК из жировой ткани (МСК-ЖТ) собаки *in vitro* при использовании разных индукционных остеогенных сред, а также после трансфекции плазмидой, содержащей видоспецифичные для собак гены *BMP2* и *VEGF164*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы

Для транспортировки биоптата жировой ткани собаки в стерильной емкости из клиники в лабораторию использовали буферный фосфатно-солевой раствор (PBS; “Биолот”, Россия), содержащий смесь пенициллина и стрептомицина (“ПанЭко”, Россия). Выделение МСК проводили с использованием раствора коллагеназы краба (“Биолот”) в конечной концентрации 0.2%. Для отмывания стромально-васкулярной фракции от фермента использовали 0.9%-ный раствор NaCl (“ПанЭко”). Полученные клетки культивировали на среде α -MEM (“ПанЭко”), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “ПанЭко”), 100 ед/мл пенициллина (“ПанЭко”), 100 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”), 2 мМ L-глутамин (“ПанЭко”). Пересев клеточной культуры проводили с использованием 0.25%-ной смеси трипсин–EDTA (“ПанЭко”).

Для определения маркеров МСК в работе использованы следующие антитела (АТ): мышинные моноклональные АТ (моноАТ) против Thy-1, меченные PE/Cy7 (Biolegend, США); кроличьи моноАТ против CD105, меченные Alexa Fluor 488 (Biolegend); мышинные моноАТ против CD73, меченные Per/Cp 5.5 (Biolegend); мышинные моноАТ против CD29, меченные PE (Biolegend); крысиные моноАТ против CD44, меченные APC/Cy7 (Biolegend); мышинные моноАТ против CD71, меченные FITC (“Сорбент”, Россия); мышинные

моноАТ против CD10, меченные FITC (“Сорбент”); мышинные моноАТ против ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, США), которые докрасивали вторичными антителами, меченными Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США); мышинные моноАТ против CD34, меченные Alexa Fluor 647 (Santa Cruz Biotechnology); мышинные моноАТ против CD45, меченные PE/Cy5 (BD Biosciences, США).

Для индукции адипогенной дифференцировки МСК-ЖТ использовали среду DMEM High glucose (“ПанЭко”), содержащую 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 1 мМ дексаметазон (Sigma, США), 100 мкМ индометацин (Sigma), 500 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX; Sigma) и 10 мкг/мл инсулина (Sigma). Окрасивание образцов проводили красителем Nile Red (Sigma). Для приготовления стокового раствора 50 мкг Nile Red растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (“КАМХИМКОМ”, Россия). Рабочий раствор красителя готовили разведением стокового в фосфатно-солевом Дюльбеко (“ПанЭко”) в соотношении 1 : 1000.

Для хондрогенной дифференцировки МСК-ЖТ использовали среду, содержащую DMEM High glucose (“ПанЭко”) с добавлением 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина, 100 мкМ пирувата натрия (“ПанЭко”), 1 \times Insulin-Transferrin-Selenium (Gibco, США), 1 мкМ дексаметазона, 0.5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma) и 10 нг/мл TGF- β 1 (Sigma). Образцы фиксировали в 95%-, затем в 70%-ном этиловом спирте и окрашивали раствором Alcian Blue (Sigma), который готовили, растворяя 1 г порошка в 100 мл 0.1 N HCl (“ПанЭко”).

Для остеогенной дифференцировки МСК-ЖТ использовали среду α -MEM, содержащую 10% FBS, 100 нМ дексаметазон, 0.5 мкМ 2-фосфат аскорбиновой кислоты, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин (“ПанЭко”), а также коммерческую среду StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, США). Качественное определение остеодифференцировки проводили окрашиванием внеклеточных кальциевых депозитов 2%-ным раствором нитрата серебра в дистиллированной воде (“ПанЭко”).

Для количественного определения отложения кальция во внеклеточном матриксе в образцах использовали окрашивание ализариновым красным S (“ПанЭко”) и определяли активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в клеточном лизате.

Выделение и иммунофенотипирование МСК-ЖТ

Получение жировой ткани собаки, выделение и культивирование МСК-ЖТ проводилось по методике, описанной ранее [13].

Иммуноцитохимию полученных клеток проводили, как описано ранее [14]. Коротко, клетки четвертого пассажа рассевали в 24-луночный планшет. При достижении монослоем 80%-ной

плотности ростовую среду убрали, клетки отмывали 0.9%-ным NaCl и фиксировали 4%-ным раствором формалина 20 мин при комнатной температуре. Зафиксированные образцы окрашивали при помощи антител, согласно инструкции фирм-производителей, после чего раствор антител удаляли и отмывали лунки 0.9%-ным NaCl. Ядра клеток окрашивали в темноте флуоресцентным красителем DAPI (Sigma) в течение 10 мин при комнатной температуре, удаляли раствор красителя и отмывали образцы 0.9%-ным NaCl. Результаты оценивали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

Дифференцировка МСК-ЖТ

Для исследования способности полученных клеточных культур к дифференцировке клетки третьего пассажа высевали в 12-луночные планшеты (3×10^4 клеток/лунка) и инкубировали в ростовой среде до получения монослоя. Для индукции дифференцировки клеточные культуры культивировали в специальных дифференцировочных средах. Дифференцировку проводили в трех направлениях: остеогенном, адипогенном и хондрогенном. Результаты регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss).

Адипогенная дифференцировка. Для ее индукции использовали среду, описанную выше. Через 10 суток среду заменяли на поддерживающую, отличающуюся отсутствием дексаметазона, индометацина и IBMX. Контрольные образцы культивировали на обычной ростовой среде. Среду меняли через каждые трое суток в течение 21 сут.

Для выявления дифференцировки в адипогенном направлении использовали качественное окрашивание жировых включений липофильным флуоресцентным красителем Nile Red. Для этого удаляли питательную среду из культуры клеток и фиксировали клетки 4%-ным раствором формалина в течение 30 мин при комнатной температуре. Перед окрашиванием лунки тщательно промывали дистиллированной водой (3×5 мин). Затем клетки инкубировали с красителем при 37°C в течение 30 мин, отмывали и окрашивали ядра клеток DAPI. Клетки инкубировали с DAPI в течение 15–30 мин при 37°C и дважды отмывали PBS. Образцы анализировали на флуоресцентном микроскопе при длинах волн возбуждения/испускания 358/461 нм для DAPI и 552/636 нм для Nile Red.

Хондрогенная дифференцировка. Как для дифференцирующихся МСК-ЖТ, так и для контрольных образцов использовали 9×10^5 клеток третьего пассажа. Клетки отмывали от питательной среды, осаждали и ресуспендировали в 90 мкл дифференцировочной или контрольной среды. Суспензии (контрольную и экспериментальную) в лунки вносили по каплям: 3 капли по 10 мкл на лунку, — после чего клетки в каплях культивировали без добавления соответствующей ростовой среды при

37°C в течение 2 ч для их агрегации. Затем в каждую лунку добавляли 500 мкл соответствующей среды. В качестве контрольной среды использовали ростовую. Смену среды проводили каждые трое суток в течение 21 сут.

Хондрогенную дифференцировку клеток оценивали по окрашиванию кислых мукополисахаридов — маркеров хондрообразования. Для этого клеточные культуры фиксировали по 5 мин сначала в 95%-ном, затем в 70%-ном этаноле и промывали дистиллированной водой (3×30 с). Клетки окрашивали 1%-ным раствором Alcian Blue в течение 1 ч и промывали проточной водой в течение 2 мин. Образцы заливали дистиллированной водой и визуализировали клетки в видимом свете с помощью инвертированного микроскопа.

Остеогенная дифференцировка. Для характеристики способности выделенных клеток к остеодифференцировке МСК-ЖТ рассевали в 6 лунок 24-луночного планшета в концентрации 5×10^5 клеток/лунка. При достижении 80%-ной конfluence в трех лунках проводили замену среды на коммерческую дифференцировочную среду. В трех контрольных лунках среду не заменяли. Клетки культивировали 21 сут, меняя среду через каждые трое суток.

Через 21 сут для определения минерализации — как признака остеогенной дифференцировки — использовали окрашивание по von Kossa [14]. Эта реакция основана на связывании ионов серебра с фосфатными группами. Полученное соединение подвергается фотохимической деградации с выделением ионов серебра, придающим минеральным депозитам серо-коричневый цвет. Перед окрашиванием удаляли питательную среду из лунок планшета, клетки промывали 0.9%-ным раствором NaCl и фиксировали 4%-ным раствором формалина в течение 30 мин при комнатной температуре. Лунки трижды тщательно промывали дистиллированной водой, заливали 2%-ным раствором нитрата серебра в дистиллированной воде и инкубировали в темноте в течение 10 мин. Клетки промывали дистиллированной водой и инкубировали при ярком свете в течение 1 ч. Затем удаляли раствор нитрата серебра, заливали дистиллированной водой и оценивали результат при помощи инвертированного микроскопа.

Для определения особенностей прохождения остеодифференцировки в разных условиях дифференциации МСК-ЖТ высевали в 24-луночный планшет и по достижении монослоя 80%-ной конfluence разделяли на четыре группы. В контрольной группе (группа 1) МСК-ЖТ культивировали обычной ростовой среде. В группе 2 (коммерческая среда) индукцию МСК-ЖТ к остеодифференцировке проводили с использованием коммерческой среды StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Life Technologies). Группу 3 (сборная среда) культивировали в индукционной среде, состоящей из остеоиндуктивных компонентов, описанных выше. Клетки группы 4 трансфицировали плазмидой pBud-clVEGF164-clBMP2,

культивировали на обычной ростовой среде. Среду меняли каждые трое суток; дифференцировку проводили в течение 21 сут.

Для количественного установления эффективности прохождения остеогенной дифференцировки МСК-ЖТ использовали два метода: определение активности ЩФ и окрашивание образцов ализариновым красным S.

Окрашивание ализариновым красным S

Для окрашивания ализариновым красным S клетки фиксировали 4%-ным формалином 30 мин при комнатной температуре, промывали фосфатным буфером, инкубировали с 2%-ным раствором красителя в течение 5 мин и отмывали дистиллированной водой. Связавшийся краситель экстрагировали 10%-ной уксусной кислотой 15 мин при покачивании на шейкере. Оптическую плотность определяли при длине волны 415 нм на спектрофотометре Infinite M200 pro (TECAN, Австрия).

Активность щелочной фосфатазы

Активность ЩФ определяли в клеточных лизатах с помощью набора Novo (“Вектор-Бест”, Россия). Для этого клетки с лунок снимали скребком, осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин. Осадок промывали PBS, отделяли центрифугированием и ресуспендировали в 100 мкл лизирующего буфера (20 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, dH₂O до 100 мл, pH 8.0) и выдерживали 24 ч при температуре –20°C. Суспензию размораживали и осаждали клеточный дебрис центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин. Активности ЩФ в супернатанте определяли согласно инструкции производителя. Оптическую плотность определяли при длине волны 400 нм на спектрометре TECAN Infinite 200 Pro (TECAN). Ферментативную активность рассчитывали на концентрацию общего белка.

Трансфекция клеток

Для создания генетической конструкции использовали экспрессионный вектор pBudCE4.1 (Invitrogen). В результате встраивания генов собаки, кодирующих VEGF-164 и BMP-2, получена плазида pBud-clVEGF164-clBMP2. Оптимизацию кодонов для генов VEGF164 и BMP2 собаки проводили с использованием алгоритма OptimumGene, как описано ранее [11]. Трансфекцию МСК-ЖТ собаки проводили с помощью трансфицирующего реагента Lipofectamine 3000 (Life Technologies) согласно инструкции производителя и по описанной ранее методике [15].

Контролем прохождения трансфекции служили клетки НЕК-293FT. Выбор этой перевиваемой линии связан с тем, что в интактных клетках НЕК-293FT нет синтеза белка BMP-2, в отличие от нативных МСК-ЖТ [16]. Контролем служили не трансфицированные клетки.

Экспрессию белка BMP-2 в НЕК-293FT исследовали через 48 ч после трансфекции с помощью электрофореза в денатурирующих условиях с последующим иммуноблоттингом. Для иммуноблоттинга использовали антитела кролика к BMP-2/4 (sc-9003, Santa Cruz) в разведении 1 : 250 и конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела к IgG кролика (Bio-Rad Laboratories, США) в разведении 1 : 2000. Визуализацию проводили с использованием хемилюминисцентного субстрата Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories).

Обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили методами первичного статистического анализа с использованием программы Excel 2016. Результаты представлены как среднее арифметическое по выборке \pm стандартное отклонение (SD). Вторичную статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные клетки адгезировались на дне культурального пластика, имели фибробластоподобную морфологию, а также экспрессировали маркеры МСК: Thy-1, CD29, CD105, CD44, CD73, CD71, CD10, ICAM-1 – и не экспрессировали маркеры гематопозитических стволовых клеток: CD34 и CD45 (рис. 1).

Минимальными признаками для идентификации выделенных из жировой ткани клеток как МСК считается наличие на цитоплазматической мембране клеток белков CD105, CD73, CD90, CD44 и HLA-ABC [17]. В этом исследовании впервые определено наличие в МСК-ЖТ собаки маркеров CD10, CD71, ICAM-1. Ранее Gimble & Guilak [18] выявили присутствие CD10, CD71, ICAM-1 в МСК-ЖТ человека.

Следует отметить, что выделенные нами клетки имели характерный для МСК потенциал дифференцировки (рис. 2).

В качестве контроля проводимой трансфекции МСК-ЖТ была использована линия клеток НЕК-293FT. Это связано с тем, что в интактных клетках НЕК-293FT не происходит синтеза белка BMP-2, в отличие от нативных МСК-ЖТ [16]. Иммуноблоттинг трансфицированных клеток НЕК-293FT выявил наличие полосы, соответствующей белку с молекулярной массой около 18 кДа (рис. 3), ожидаемой для BMP-2. Таким образом, подтверждена функциональность конструкции pBud-clVEGF164-clBMP2 *in vitro* и правильное прохождение трансфекции.

Превращение МСК в остеобласты проходит в несколько этапов: пролиферация остеогенных клеток, выработка внеклеточного матрикса и его минерализация. К основным признакам проходящей остеодифференцировки относится изменение мор-

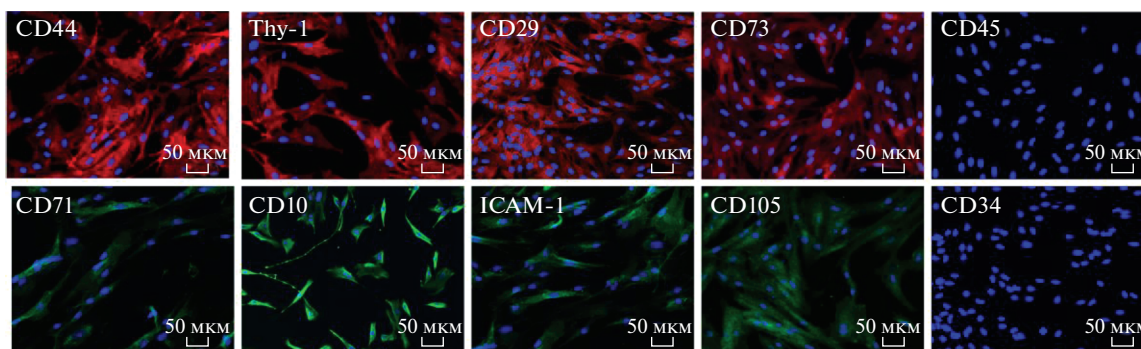


Рис. 1. Иммунофенотип МСК-ЖТ собаки. Идентификационные маркеры МСК: CD44 (флуорохром APC/Cy7), Thy-1 (флуорохром PE/Cy7), CD29 (флуорохром PE), CD73 (флуорохром Per/Cp 5.5), CD71 (флуорохром FITC), CD10 (флуорохром FITC), CD105 (флуорохром Alexa Fluor 488), ICAM-1 (флуорохром Alexa Fluor 488). Отрицательный контроль: CD45 (флуорохром PE/Cy5), CD34 (флуорохром Alexa Fluor 647).

Fig. 1. Immunophenotype of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue of dog. Identification markers: CD44 (fluorochrome APC/Cy7), Thy-1 (fluorochrome PE/Cy7), CD29 (fluorochrome PE), CD73 (fluorochrome Per/Cp 5.5), CD71 (fluorochrome FITC), CD10 (fluorochrome FITC), CD105 (fluorochrome Alexa Fluor 488), ICAM-1 (fluorochrome Alexa Fluor 488). Negative control: CD45 (fluorochrome PE/Cy5), CD34 (fluorochrome Alexa Fluor 647).

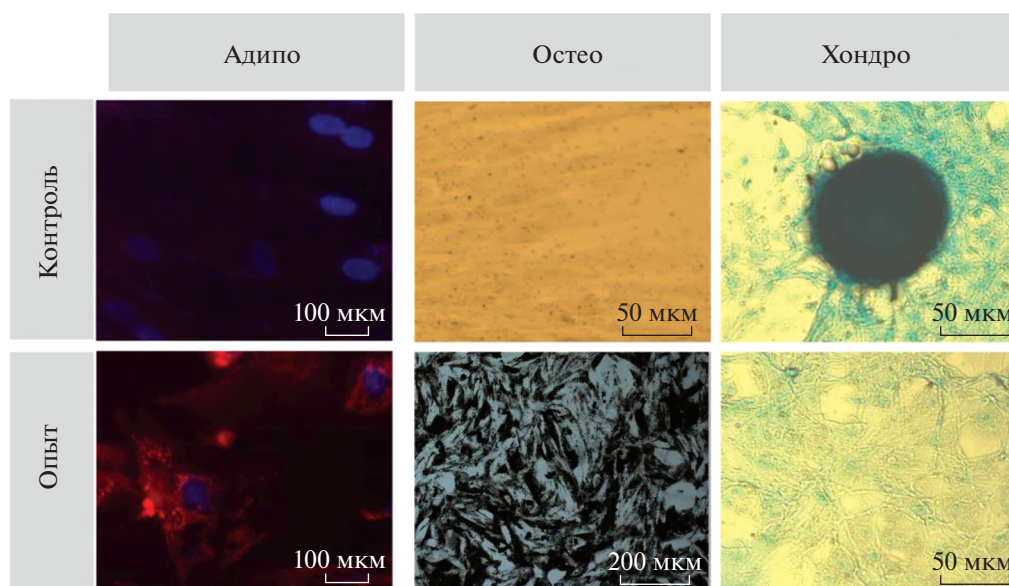


Рис. 2. МСК-ЖТ собаки после индукции дифференцировки в трех направлениях: адипогенном (Адино), остеогенном (Остео) и хондрогенном (Хондро). Жировые включения в клетках окрашены липофильным красителем Nile Red в желто-оранжевый цвет; ядра на препаратах докрашены DAPI (синий цвет). Минеральные кальциевые отложения, образующиеся во время дифференцировки МСК-ЖТ, окрашены в серо-коричневый цвет в результате проведения реакции по von Kossa. Кислые мукополисахариды внеклеточного матрикса, образующиеся при дифференцировке МСК-ЖТ в хондроциты, окрашены в голубой цвет красителем Alcian Blue.

Fig. 2. Canin mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (MSC-AT). Adipogenic differentiation: cell nuclei are stained with DAPI (blue), adipose tissue inclusions within cells are dyed with Nile Red (yellow-orange). Osteogenic differentiation: mineral calcium deposits formed during differentiation of MSC-AT are stained gray-brown by the von Kossa reaction. Chondrogenic differentiation: acid mucopolysaccharides of the extracellular matrix formed within the differentiation of MSC-AT into chondrocytes are stained with Alcian Bue.

фологии клеток, выработка ЩФ, белков внеклеточного матрикса и минерализация матрикса [19]. О начале дифференцировки МСК в направлении остеогенеза может свидетельствовать активность ЩФ. Этот фермент активен на ранних стадиях дифференцировки клеток в остеобласты [20]. Маркером дифференцировки также служит отложение в матриксе солей кальция [21].

Для установления прохождения дифференциации МСК-ЖТ в остеогенном направлении и наличия остеобластов в культуре определяли активность ЩФ в образцах. Согласно полученным данным (табл. 1), активность ЩФ была наиболее высокой в трансфицированных плазмидой МСК-ЖТ. При культивировании МСК-ЖТ на коммерческой индукционной среде активность

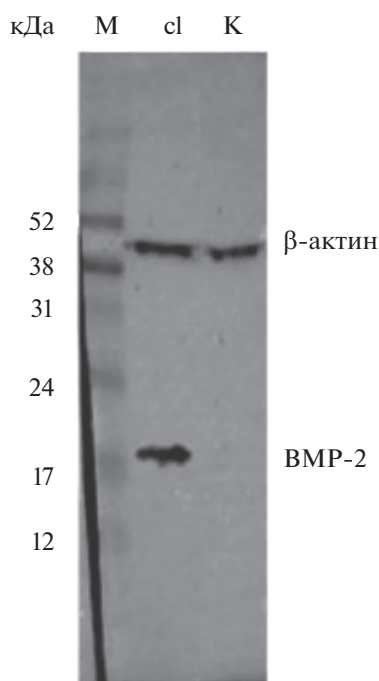


Рис. 3. Анализ экспрессии белка BMP-2 в трансфицированных клетках HEK-293FT методом иммуноблоттинга. Для детекции в качестве первичных использованы антитела кролика к BMP-2/4 (sc-9003, Santa Cruz) и мышьиные антитела к β -актину (AC-17; Sigma), а в качестве вторичных – антитела против IgG кролика (A0545, Sigma) и мыши (A9044, Sigma), конъюгированные с пероксидазой хрена. М – маркер молекулярной массы белков RPN756E (GE LifeSciences, США), cl – клетки HEK-293FT, трансфицированные плазмидой pBud-clVEFG-clBMP2; K – контроль (не-трансфицированные клетки HEK-293FT).

Fig. 3. Western-blot analysis of biosynthesis BMP-2 protein in HEK-293FT cells transfected with pBud-clVEFG-clBMP2. For detection, rabbit antibody to BMP-2/4 (sc-9003, Santa Cruz) and mouse antibody to β -actin (AC-17; Sigma) were used as primary and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (A0545, Sigma) and anti-mouse (A9044, Sigma) IgG antibody were used as secondary ones. M – molecular weight protein marker RPN756E (GE LifeSciences, USA), cl – HEK-293FT cells transfected with pBud-clVEFG-clBMP2, K – control (non-transfected cells).

ЩФ была самой низкой из всех образцов, подвергшихся дифференцировке.

С целью определения уровня минерализации как признака остеогенной дифференцировки и

наличия зрелых форм остеоцитов, откладывающих кальций, использовали методику идентификации кальциевых депозитов по окрашиванию ализариновым красным S. Этот краситель образует цветные соединения с солями кальция во внеклеточной среде и с минерализующимся органическим матриксом [22].

Полученные нами результаты показывают значительное связывание красителя кальцием внеклеточного матрикса в образцах с коммерческой средой по сравнению с контролем (табл. 1). Оптическая плотность в образцах с трансфицированными клетками достоверно от контроля не отличалась, что говорит о незначительном отложении кальция.

Таким образом, в образцах, трансфицированных МСК-ЖТ собаки, выявлено высокое содержание ЩФ – раннего маркера остеодифференцировки – и небольшое количество депозитов внеклеточного кальция. Низкое содержание кальция в этом случае может быть обусловлено тем, что клетки либо находятся на начальном этапе остеодифференцировки, либо, как показано ранее [23], для МСК собаки одного только фактора BMP-2 недостаточно для реализации конечных этапов остеогенеза, связанных с формированием высокоспецифичных клеток костной ткани *in vitro*.

МСК-ЖТ, подвергшиеся остеодифференцировке на коммерческой среде, характеризуются низкой активностью ЩФ при значительной минерализации внеклеточного матрикса. Эти образцы находятся на завершающем этапе остеодифференцировки. Культивирование МСК-ЖТ на сборной среде также стимулировало образование кальциевых депозитов во внеклеточном матриксе.

В результате проведенного нами анализа остеодифференцировки образцов МСК-ЖТ собаки содержание ЩФ и связывания ализаринового красного S можно говорить об обратной корреляции этих показателей, равной -0.6 ($p \leq 0.01$). Это объясняется тем, что непосредственно процесс минерализации начинается после накопления остеобластами большого количества ЩФ – фермента, под воздействием которого происходит отложение кальция. Окружая себя минерализованным матриксом, остеобласты осуществляют терминальную дифференцировку, превращаясь в зрелые высокодифференцированные клетки костной ткани – остеоциты. Заметим, что при этом биохимическая активность клеток снижается [24].

Таблица 1. Эффективность различных методов остеоиндукции МСК-ЖТ собаки

Table 1. The effectiveness of various methods of osteoinduction of canin mesenchymal stem cells derived from adipose tissue

Параметры	Контроль	Коммерческая среда	Сборная среда	Трансфицированные клетки
Активность ЩФ, ед/л	1.7 ± 0.02	2.3 ± 0.01^a	4.3 ± 0.3^b	6.2 ± 0.1^c
Оптическая плотность, OD ₄₀₀	0.134 ± 0.008	0.733 ± 0.110^c	0.175 ± 0.01^a	0.135 ± 0.007

Примечание: ^a $p \leq 0.05$; ^b $p \leq 0.005$; ^c $p \leq 0.001$ по сравнению с соответствующим контролем.

Note: ^a $p \leq 0.05$; ^b $p \leq 0.005$; ^c $p \leq 0.001$ compared to the corresponding control.

На основании полученных результатов можно предполагать, что трансфекция МСК-ЖТ собаки *in vitro* при помощи плазмиды pBud-clVEGF164-clBMP2 индуцирует начало остеогенеза, но не ведет к отложению солей кальция во внеклеточном матриксе. Коммерческая дифференцировочная среда оказалась для этих клеток наиболее подходящим вариантом для остеодифференцировки МСК-ЖТ, так как при ее использовании наблюдалась наиболее обширная кальцификация внеклеточного матрикса. По-видимому, именно ее предпочтительно использовать для лабораторных исследований в области ветеринарной регенеративной медицины. В условиях отсутствия коммерческой дифференцировочной среды для прохождения образцами всех этапов остеодифференцировки можно воспользоваться многокомпонентной прописью среды, представленной в статье.

Механизмы индукции дифференцировки МСК в остеонаправлении сложны и остаются пока предметом фундаментального изучения [18]. Полученные нами данные об особенностях остеодифференцировочного процесса МСК после трансфекции плазмидным препаратом могут быть использованы не только в фундаментальной науке при изучении механизмов остеогенеза, но и в современной ветеринарии, где МСК применяют в качестве индуктора остеогенеза при терапии сложных, долго не срастающихся переломов у собак [25]. Нами показано, что МСК собаки, трансфицированные плазмидой с геном *BMP2*, инициируют остеогенез даже при отсутствии в окружающей среде остеиндуктивных факторов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

На проведение процедуры по забору жировой ткани было получено разрешение локального этического комитета Казанского федерального университета (Разрешение № 1 от 23.02.2015 на проведение научного исследования по теме “Генная и клеточная терапия в регенеративной ветеринарной медицине”). На проведение всех операций по забору жировой ткани было получено письменное согласие владельца животного.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 2006, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
2. *Jaiswal R.K., Jaiswal N., Bruder S.P., Mbalaviele G., Marshak D.R., Pittenge M.F.* Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(13), 9645–9652. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9645>
3. *Mardaryev A.N., Sharov A.A., Baryshnikov A.Yu.* Bone morphogenetic proteins and its role in skin cancerogenesis. *Russ. J. Biotherapy*, 2007, 6, 44–50.
4. *Tóth F., Gáll J.M., Tózsér J., Hegedűs C.* Effect of inducible bone morphogenetic protein 2 expression on the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells *in vitro*. *Bone*, 2021, 132(12), 115214. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115214>
5. *Taekhee J., John H.L., Soonjung P., Yong-Jin K., Joseph S., Hye-Eun S., Ki-Suk K., Hyon-Seok J., Hyung-Min C., Seong-Geun O., Sung-Hwan M., Sun-Woong K.* Effect of BMP-2 delivery mode on osteogenic differentiation of stem cells. *Stem Cells Int.*, 2017, 7859184. <https://doi.org/10.1155/2017/7859184>
6. *Недорубова И.А., Бухарова Т.Б., Васильев А.В., Гольдштейн Д.В., Кулаков А.А.* Невирусная доставка гена *BMP2* для регенерации костной ткани. *Гены и клетки*, 2020, 4, 33–39. <https://doi.org/10.23868/202012005>
7. *Dong J.-L., Li L.X., Mu W.-D., Wang Y.-H., Zhou D.S., Hao W., Zou D.B., Hu K., Li J., Cui F.-Z.* Bone regeneration with BMP-2 gene-modified mesenchymal stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactic acid) scaffolds. *J. Bioact. Compat. Polym.*, 2010, 25, 547–566. <https://doi.org/10.1177/0883911510380436>
8. *Wegman F., Bijenhof A., Schuijff L., Oner F., Dhert W., Alblas J.* Osteogenic differentiation as a result of BMP-2 plasmid DNA based gene therapy *in vitro* and *in vivo*. *Eur. Cells Mater.*, 2011, 21, 230–242. <https://doi.org/10.22203/ecm.v021a18>
9. *Zhuravleva M.N., Khaliullin M.R., Masgutov R.F., Deev R.V., Rizvanov A.A.* Recombinant plasmid DNA construct encoding combination of *vegfl65* and *bmp2* cDNAs stimulates osteogenesis and angiogenesis *in vitro*. *BioNanoScience*, 2017, 7, 288–293. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0300-3>
10. *Zhuravleva M.N., Khaliullin M.R., Masgutov R.F., Bozo I.Y., Rizvanov A.A., Deev R.V.* Comparative analysis of the effect of gene-activated grafts carrying a PBUD-VEGF165A-BMP2 plasmid on bone regeneration in a rat femur defect model. *BioNanoScience*, 2019, 9, 909–917. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00673-5>
11. *Журавлева М.Н., Закирова Е.Ю., Масгутов Р.Ф., Валуллин В.В., Деев Р.В., Ризванов А.А.* Влияние рекомбинантных плазмидных конструкций, кодирующих комбинации генов *vegfl65* и *bmp2* собаки и лошади, на дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток *in vitro*. *Гены и клетки*, 2015, 10(3), 42–48.
12. *Закирова Е.Ю., Журавлева М.Н., Масгутов Р.Ф., Усманов Р.А., Ризванов А.А.* Выделение, анализ и применение аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани

- собаки для лечения ложного сустава большеберцовой кости. *Гены и клетки*, 2014, 9(3), 70–75.
13. Закирова Е.Ю., Васин Н.Н., Журавлева М.Н., Ризванов А.А. Случай применения генных конструкций с *VEGF* и *BMP2* в ветеринарии при восстановлении передней крестообразной связки у собаки крупной породы. *Гены и клетки*, 2014, 9(2), 93–95.
 14. Закирова Е.Ю., Валева А.Н., Файзуллина Р.Р., Ахметшин Р.Ф., Нефедовская Л.В., Ризванов А.А. Использование мезенхимальных стромальных клеток для лечения посттравматических язв роговицы у кошек. *Гены и клетки*, 2015, 10(3), 49–55.
 15. Закирова Е.Ю., Аймалетдинов А.М., Александрова Н.М., Ганиев И.М., Софронова С.А., Валева А.Н., Гаранина Е.Е., Ризванов А.А. Создание видоспецифичного генного препарата для лечения дефектов кожи собак. *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки*, 2020, 162(3), 361–380. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2020.3.361-380>
 16. Sarmila N., Mira P., Helen L., Okjoon K. Comparative analysis of human adipose-derived mesenchymal stem cells from orbital and abdominal fat. *Stem Cells Int.*, 2018, 2018, 3932615. <https://doi.org/10.1155/2018/3932615>
 17. Закирова Е.Ю., Аймалетдинов А.М., Тамбовский М.А., Ризванов А.А. Сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток различных клеток животных. *Цитология*, 2021, 63(2), 139–146. <https://doi.org/10.31857/S0041377121020097>
 18. Gimble J., Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 2003, 5(5), 362–369. <https://doi.org/10.1080/14653240310003026>
 19. Caliarì S.R., Harley B.A.C. Structural and biochemical modification of a collagen scaffold to selectively enhance MSC tenogenic, chondrogenic, and osteogenic differentiation. *Adv. Healthc. Mater.*, 2014, 3(7), 1086–1096. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300646>
 20. Naumenko E., Zakirova E., Guryanov I., Valeeva A., Fakhruллин R. Composite biodegradable polymeric matrix doped with halloysite nanotubes for the repair of bone defects in dogs. *Clays Clay Miner.*, 2021, 69, 522–532. <https://doi.org/10.1007/s42860-021-00152-7>
 21. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
 22. Жерносеченко А., Исайкина Я., Михалевская Т. Выбор носителя и условий дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток для восстановления костной ткани. *Наука и инновации*, 2019, 5, 58–61.
 23. Юрова К.А., Мелашенко Е.С., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Мелашенко О.Б., Шунькин Е.О., Норкин И.К., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Мезенхимные стволовые клетки: краткий обзор классических представлений и новых факторов остеогенной дифференцировки. *Медицинская иммунология*, 2021, 23(2), 207–222. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-MS-2128>
 24. Yeom J., Ma S., Lim Y.H. Probiotic propionibacterium freudenreichii MJ2 enhances osteoblast differentiation and mineralization by increasing the OPG/RANKL ratio. *Microorganisms*, 2021, 9(4), 673. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040673>
 25. Franco G.G., Minto B.W., Dreibi R.M., Junior J.S.C., Gosuen Gonçalves Dias L.G. Percutaneous application of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell in dogs submitted to minimally invasive plate osteosynthesis of the tibia. *Acta Cir. Bras.*, 2021, 36(2), e360206. <https://doi.org/10.1590/ACB360206>

Features of Induction of Osteodifferentiation *in vitro* Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells

N. M. Aleksandrova^a, A. M. Aimaletdinov^a, A. G. Malanyeva^a,
M. A. Tambovskii^{a, #}, A. A. Rizvanov^{a, b}, and E. Yu. Zakirova^{a, ##}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bRepublican Clinical Hospital, Ministry of Health
of the Republic of Tatarstan, Kazan, 420064 Russia

[#]e-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com

^{##}e-mail: lenahamzina@yandex.ru

Abstract—The features of osteogenic differentiation of dog mesenchymal stem cells (MSCs), native and genetically modified, have been compared when cultivated in different media. It was shown that calcium deposition into the extracellular matrix occurred within 21 day of MSCs cultivation on a commercial induction medium. The use of an α -MEM-based medium, which contains osteoinducing components, also caused osteogenic differentiation of MSCs, but calcium deposition was less active. Gene modification of canine MSCs with a plasmid carrying the gene for dog (*Canis familiaris*) bone morphogenetic protein 2 gene (*BMP2*) stimulated the release of alkaline phosphatase by cells, but not calcium deposition. Consequently, the formation of osteocytes from MSCs depends not only on endogenous, but also exogenous factors, which include dexamethasone in combination with ascorbic acid and β -glycerophosphate, and full osteogenic differentiation of MSCs *in vitro* requires a lot of osteoinductive factors.

Keywords: mesenchymal stem cells, osteodifferentiation, bone morphogenetic protein