

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Наталья Михайловна АСТАХОВА^{1,2}, Анастасия Викторовна КОРЕЛЬ¹,
Константин Евгеньевич ОРИЩЕНКО³, Ярослав Рейнгольдович ЕФРЕМОВ^{3,4},
Глеб Александрович КУДРОВ¹, Ирина Анатольевна КИРИЛОВА¹

¹ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

² АО «Инновационный медико-технологический центр (Медицинский Технопарк)»
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 19-а

³ ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

⁴ Новосибирский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

В статье приведены данные по культивированию и характеристике мезенхимальных стромальных клеток (МСК), выделенных из костного мозга пациентов с диспластическим коксартрозом. Во фракции адгезивных МСК из обоих образцов костного мозга выявлено несколько морфологических фенотипов: веретенообразные удлиненные клетки, большие уплощенные клетки и тонкие звездчатые клетки. Иммунофенотипический анализ показал, что по характеру и уровню экспрессии поверхностных антигенов (CD90, CD73, CD105, CD45 и CD34) клетки представляют собой популяции МСК. Использование для культивирования МСК человека новой ростовой среды, не содержащей компонентов животного происхождения, позволяет МСК достигать конfluence на 16–18 день инкубации, без замедления пролиферативной активности клеток и без потери способности к дифференцировке в хондро- и остеогенные типы тканей. Мультипотентность МСК подтверждена остеогенной и хондрогенной дифференцировкой клеток при их длительном культивировании в соответствующих индукционных средах *in vitro*. Дифференцировку МСК в остеобласты подтверждали иммуноцитохимическим окрашиванием на щелочную фосфатазу и ализариновым красным. Специфическую дифференцировку МСК по хондрогенному типу выявляли иммуноцитохимическим окрашиванием хрящевых депозитов альциановым синим. Впервые определены такие характеристики МСК человека, как митотический индекс, траектории и средняя скорость движения клеток на культуральном пластике. Митотический индекс активно пролиферирующих МСК составил от 2,7 до 3,4 % от общего количества клеток, двигательная активность (скорость миграции) – 38–42 мкм/ч. Таким образом, аспират костного мозга от пациентов с ортопедической патологией является источником МСК, которые удовлетворяют критериям, определенным Международным обществом клеточной терапии, и могут быть использованы в регенеративной терапии костной и хрящевой тканей.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, костный мозг, диспластический коксартроз, митотический индекс, скорость миграции, дифференцировка, регенерация кости и хряща.

Астахова Н.М. – к.б.н., старший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, специалист по клеточным технологиям, e-mail: NAstakhova@niito.ru

Корель А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: akorel@niito.ru

Орищенко К.Е. – к.б.н., зав. сектором клеточных технологий, e-mail: OrishchenkoKE@icg.sbras.ru

Ефремов Я.Р. – ведущий инженер ЦКП микроскопического анализа биологических объектов, e-mail: yarex@bionet.nsc.ru

Кудров Г.А. – младший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: g16kud@gmail.com

Кирилова И.А. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: irinakirilova71@mail.ru

Одной из главных проблем травматологии и ортопедии остается замещение дефектов костной ткани опорно-двигательного аппарата. В настоящее время широкое распространение получили методы клеточной терапии, основанные на применении остеогенных клеток, дифференцированных из МСК, полученных из различных тканевых источников: костного мозга, жировой ткани, пульпы зуба, периферической крови и т.д. [7, 11, 13–15]. Одним из требований к пластическому материалу является тканеспецифичность, отсутствие токсичности, высокий регенераторный потенциал и формирование органоспецифической костной ткани в зоне трансплантации. Для обеспечения запросов практической хирургии необходимы тканеинженерные конструкции, пригодные для замещения костных дефектов, характеризующиеся следующими свойствами: сохранение физических и анатомических особенностей кости, высокая прочность, быстрая фиксация в зоне имплантации и замещение тканью реципиента, отсутствие реакции отторжения имплантата.

Главная стратегия тканевого инжиниринга заключается в следующем: 1) выделение МСК и их пролиферация *in vitro*, 2) заселение на трехмерный скаффолд и 3) имплантация скаффолда в очаг повреждения [10, 17]. Внедрение данной стратегии в медицинскую практику требует проведения дополнительной хирургической процедуры и временных затрат, которые необходимы для создания костного трансплантата *in vitro*. Костный мозг является резервуаром МСК для ряда соединительных тканей, которые могут дифференцироваться в остеогенные, хондрогенные и жировые клетки [5, 6]. В условиях хирургического стационара травматолого-ортопедического профиля использование такого ресурса, как резецированные при первичном эндопротезировании полусуставы, представляется целесообразным. Поскольку объем первичных операций постоянно растет, то ограничения в источнике костного мозга, при согласии пациента, нет. А увеличение ревизионных операций, связанных с дефицитом костной ткани, формирует запрос клиницистов на тканеинженерные конструкции, обладающие высокими прочностными свойствами.

Как первый шаг в создании подобных конструкций, нами выполнены забор костного мозга у двух пациентов, выделение МСК, культивирование и описание их характеристик. В нашем эксперименте МСК из аспириатов костного мозга служили источником остеогенных и хондрогенных клеток человека, которые в дальнейшем предполагается использовать для заселения трехмерных имплантатов («скаффолдов») с перспективой ис-

пользования для восстановления костной и хрящевой тканей. Дифференцировка этих клеток проводилась *in vitro* путем изменения условий культивирования в процессе роста. Ее можно также инициировать, обеспечивая новое физиологическое микроокружение в области трансплантации *in vivo* [8]. Кроме того, в ряде работ было показано, что жесткость субстрата и топография поверхности «скаффолда», а также биомеханические воздействия на трехмерные каркасы значительно влияют на развитие тканей, морфогенез, патогенез и заживление, особенно в ортопедических тканях. Такие биологические процессы критически связаны с дифференцировкой МСК человека. Текущие исследования предполагают использование различных факторов для контроля процесса дифференцировки МСК и ускорения процесса создания трехмерных тканеинженерных конструкций [12, 18].

Пролиферация МСК, выделенных из клеточного аспириата костного мозга, зависит от объема, техники выделения и культивирования клеток. В связи с новыми международными требованиями к культивированию МСК пациентов *in vitro* без реагентов животного происхождения была использована усовершенствованная безсыворочная питательная среда. Исследовали следующие характеристики выделенных МСК: адгезия, экспрессия специфических CD-маркеров, сохранение мультипотентности, дифференцировка, пролиферативный потенциал (митотический индекс), двигательная активность (скорость миграции). Изучение динамических характеристик МСК и подбор оптимальных условий культивирования позволят разработать стандартные подходы для новых технологий получения индивидуальных тканеинженерных конструкций в регенеративной медицине.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

МСК человека были выделены из аспириатов костного мозга резецированных головок бедренных костей пациентов с диспластическим коксартрозом при операции первичного эндопротезирования тазобедренных суставов в Новосибирском НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России. В экспериментах были использованы МСК от двух доноров (женщины, возраст 37 лет и 41 год), с общим числом пассажей от 0 до 4. МСК пациенток удовлетворяли критериям, определенным Комитетом международного общества по клеточной терапии. Минимальный набор стандартных критериев для определения МСК человека следующий: во-первых, они должны быть пластик-адгезивными при куль-

тивировании в стандартных условиях; во-вторых, должны экспрессировать CD105, CD73 и CD90 и быть негативными по поверхностным антигенам CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79a или CD19, HLA-DR; в-третьих, должны дифференцироваться в остеобласты, адипоциты или хондробласты при культивировании *in vitro* в индукционных средах [9, 12].

Настоящее исследование соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Работа получила одобрение локального этического комитета Новосибирского НИИ им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России (протокол № 011/16 от 04.10.2016). Все лица дали информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение и культивирование. Аспираты костного мозга, полученные при хирургической операции в стерильных условиях, промывали модифицированной по Дульбекко средой Игла (Sigma, США) с добавлением 100 Ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона (Life Technologies, США), процеживали через нейлоновое сито с диаметром пор 100 мкм. Суспензию клеток костного мозга разводили в соотношении 1 : 2 0,9%-м NaCl, наслаивали на градиент плотности PANcoll (PAN biotech, Германия) ($d = 1,077$ г/мл) и центрифугировали при 1300 g в течение 15 мин [1, 2]. Ядродержащие клетки переносили в отдельную пробирку, отмывали от PANcoll центрифугированием при 1500 g в течение 15 мин в бессывороточной среде DMEM с добавлением 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона. Надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали в ростовой среде и переносили в культуральные флаконы с поверхностью роста клеток 25 см² или в чашки Петри с поверхностью роста клеток 10 см² (Techno Plastic Products AG, Швейцария). Культивирование клеток с нулевого пассажа проводили в специальной бессывороточной ростовой среде PowerStem MSC1 (PAN biotech), содержащей 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мг/мл фунгизона, при 37 °С в CO₂-инкубаторе (5 % концентрации CO₂). Через 48 ч после посева первичной культуры клетки, не прикрепившиеся к пластику, удаляли путем смены среды. Фракцию адгезивных МСК культивировали до образования 80–90 % конфлюэнтного монослоя, среду заменяли

каждые 3–4 дня. Клетки 0–4 пассажей были использованы для следующих экспериментов.

Иммуноцитометрические исследования. Конфлюэнтный монослой культуры клеток снимали с культурального пластика путем добавления 0,25 % раствора трипсина (Sigma) в 1мМ растворе ЭДТА в течение 1–3 мин при 37 °С. Затем промывали центрифугированием в бессывороточной среде PowerStem hMSC (PAN biotech) при 1300 g в течение 5 мин. Далее суспензию МСК пропускали через клеточный фильтр с диаметром пор 40 мкм для удаления крупных конъюгатов, после чего инкубировали с флуорохром-конъюгированными антителами на льду в течение 20 мин. Полученные таким образом образцы клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria (BD Biosciences, США). Иммунофенотипический анализ (экспрессию наиболее общих позитивных и отсутствие экспрессии негативных поверхностных антигенных маркеров) МСК проводили на 0–2 пассаже с применением антител к CD90 (1 : 80), CD73 (1 : 750), CD105 (1 : 500) CD45 (1 : 150) и CD34 (1 : 20). Использовали моноклональные антитела к CD90-FITC (Abcam, Великобритания), CD73-PE (BD Pharmingen, США), CD105-PE (BD Pharmingen), CD45-FITC (BioLegend, США), CD34-Alexa Fluor (BD Pharmingen). Данные иммунофенотипического анализа обрабатывали с использованием программного обеспечения 2.5.1 для проточной цитометрии.

Cell-IQ анализ МСК. Для анализа пролиферативного потенциала (митотический индекс) и двигательной активности (скорость миграции) выделенные МСК культивировали в течение четырех дней с использованием системы длительного наблюдения за живыми клетками – Cell-IQ (CM Technologies, Германия). Параметры культивирования: температура 37 °С; 5%-й увлажненный O₂ прокачивался непосредственно через культуральный планшет; периодичность подачи газа – 15 мин включен, 15 мин выключен; первичная подача газа – 30 мин. Параметры съемки: объектив – Nikon CFI Plan Fluorescence DL 10x (Nikon, Япония); частота съемки – 12 изображений в час; количество полей съемки – 12 на одну лунку шестилуночного планшета. Полученные изображения анализировали с помощью специализированного программного обеспечения Cell-IQ Analyser. Для оценки митотического индекса считали общее количество клеток и количество клеток, находящихся в состоянии деления. Для этого создавали библиотеку изображений для детекции и дифференцировки распластанных клеток, делящихся клеток, клеточных отростков, структур цитоплазмы в клетках большого

диаметра и клеточного дебриса. На основе данной библиотеки и подобранных параметров (минимального расстояния между соседними клетками, максимального диаметра клетки, симметрии клетки и др.) были проанализированы все полученные изображения. Митотический индекс рассчитывали как отношение числа делящихся клеток к их общему количеству. Двигательную активность оценивали для 20 случайно выбранных клеток по измерению протяженности траектории, пройденной клеткой за время съемки, либо до момента, пока она находилась в поле съемки. Маркировку клеток осуществляли в ручном режиме по центру ядер. Пройденную траекторию рассчитывали, измеряя расстояние между метками.

Мультилинейная дифференцировка МСК *in vitro*. Для оценки мультипотентности МСК индуцировали дифференцировку клеток по остеогенному и хондрогенному типу путем культивирования их в индукционных средах в условиях культуры. Для иммуноцитометрического анализа МСК в концентрации $0,3 \times 10^4/\text{см}^2$ рассеивали в культуральные флаконы площадью 25 см^2 . Для гистохимического анализа клеток и анализа на аппарате Cell-IQ МСК рассеивали в 6-луночные планшеты. Для осуществления остеогенной дифференцировки МСК инкубировали в среде StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco), для инициации хондрогенной дифференцировки использовали StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco). Полные культуральные среды включали все необходимые реагенты для направленной дифференцировки МСК, но не содержали сыворотки животного происхождения. Для выявления экспрессии маркеров остеобластного профиля на 14-е сутки инкубирования клеток в индукционной остеогенной среде определяли активность щелочной фосфатазы (Amresco, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Для визуализации минеральных отложений внеклеточного матрикса клетки после 21 суток инкубирования в индукционной среде дважды промывали в PBS (без Ca^{++} и Mg^{++}), наслаивали 10%-й формалин и фиксировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем удаляли раствор формалина, дважды отмывали клетки деионизованной водой и окрашивали 2%-м раствором ализаринового красного (рН 4,1) в течение 20 мин, после чего отмывали шесть раз деионизованной водой, чтобы удалить лишнюю краску. Хондрогенную дифференцировку подтверждали гистохимическим окрашиванием хрящевых депозитов альциановым синим. Клетки обоих типов ткани анализировали и фотографировали с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2012 (blue edition).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Адгезивная фракция МСК, изолированных из костного мозга, относительно легко наращивается *in vitro* в специальных ростовых средах без дифференцировки. Ранее рядом авторов [4, 16] показано, что условия *in vitro* наращивания МСК могут приводить к постепенной потере характеристик ранних предшественников и к замедлению скорости пролиферации уже ко второму пассажу. Тип питательной среды и использование добавок оказывают существенное влияние на генотип и фенотип МСК, что следует учитывать при выборе оптимальных условий культивирования клеток для клинического использования [4]. В нашем эксперименте МСК достигали конfluence на 16–18 день инкубирования (0 пассаж), без замедления пролиферативной активности клеток и без потери способности к дифференцировке в хондро- и остеогенные типы тканей. Это объясняется применением новой высококачественной, не содержащей сыворотки плодов коров и компонентов животного происхождения, ростовой среды PowerStem MSC1, специально разработанной для пролиферации и длительного культивирования МСК человека без дифференцировки клеток. Росточная среда PowerStem MSC1 содержит соли, аминокислоты, гормоны, ростовые факторы и обогащена белками и липидами из компонентов крови человека по оптимизированной рецептуре, при строжайшем соблюдении стандартов производства высокого качества.

Известно, что МСК представляют собой гетерогенную популяцию клеток [3, 4]. На уровне клеточных колоний мы определили несколько морфологических фенотипов: веретенообразные удлиненные клетки, большие уплощенные клетки и тонкие звездчатые клетки (рис. 1, а–в). Оба образца МСК пациентов имели сходные морфологические типы клеток, значимых различий между ними не обнаружено.

В результате иммунофенотипического анализа было показано, что профили экспрессии поверхностных антигенов культивируемых МСК соответствовали принятым стандартам [9]. В частности, более 90 % клеток экспрессировали CD90, CD73, CD105 – положительные маркеры, типичные для МСК (рис. 2). В то же время более 95 % клеток были негативны по CD45 (общий лейкоцитарный антиген) и по CD34 (маркер ранних кроветворных предшественников), что свидетельствует об отсутствии их примесей в популяции МСК (см. рис. 2). Различия по экспрессии CD-маркеров между образцами клеток от разных доноров были статистически недостоверными. Таким образом, иммунофенотипический

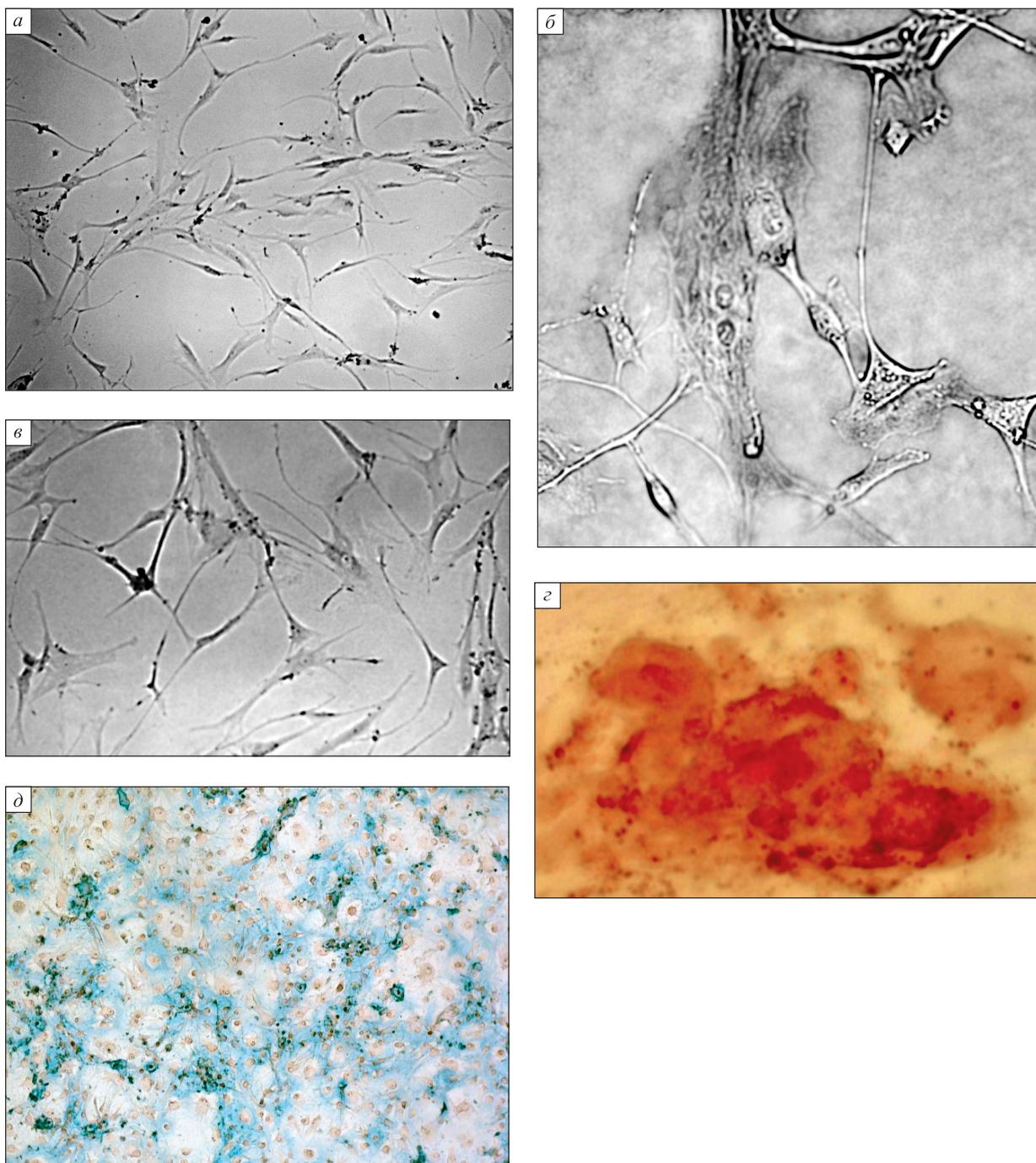


Рис. 1. Фенотип и гистохимическая характеристика мультипотентности МСК человека. В колониях МСК наблюдались три клеточных фенотипа: а – веретенообразные клетки (ув. $\times 10$), б – большие уплотненные клетки (ув. $\times 63$), в – звездчатые клетки (ув. $\times 20$), г – окраска на ализариновый красный S, плотность минерализации соединений кальция пропорциональна интенсивности красной окраски при остеогенной дифференцировке МСК (ув. $\times 63$), д – окраска на ализариновый синий, ядра клеток окрашены ядерным красным быстрым, хрящевые депозиты внеклеточного матрикса окрашены от бледно-голубого до темно-синего в зависимости от плотности при хондрогенной дифференцировке МСК (ув. $\times 10$)

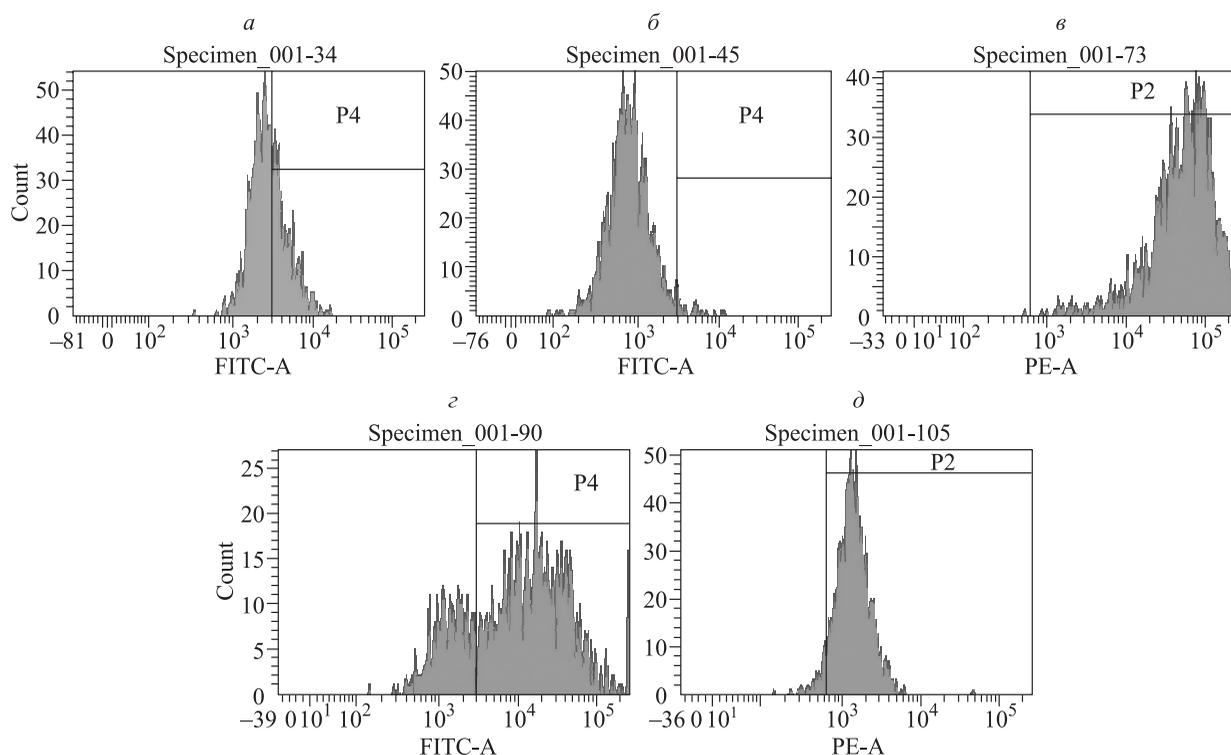


Рис. 2. Анализ поверхностного антигенного фенотипа МСК из костного мозга: а – CD34, б – CD45, в – CD73, з – CD90, д – CD105. Горизонтальные линии показывают анализируемые участки в сравнении с профилем неокрашенных клеток. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (логарифмическая шкала), по оси ординат – количество событий

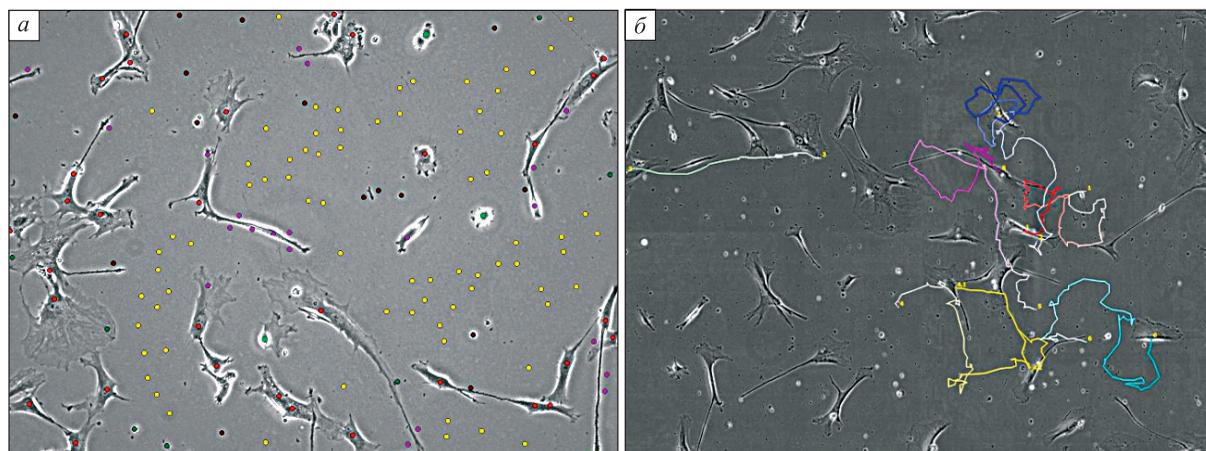


Рис. 3. Анализ изображений при помощи программного обеспечения Cell-IQ Analyser. а – красными точками обозначены детектированные распластанные клетки, светло-зелеными – делящиеся клетки, темно-зелеными – цитоплазма в клетках большого диаметра, розовыми – клеточные отростки, бордовыми – дебрис, желтыми – фон изображения; б – пример определения траекторий движения пяти случайно выбранных клеток. Траектории движения разных клеток окрашены в разные цвета

анализ показал, что по характеру и уровню экспрессии исследованных поверхностных антигенов (CD90, CD73, CD105, CD45 и CD34) культуры МСК человека на ранних пассажах (0–4) представляют собой практически гомогенную популяцию МСК.

Анализ клеточной пролиферации позволил определить общее число клеток, количество делящихся клеток и их соотношение. С помощью созданной библиотеки изображений идентифицировали распластанные, делящиеся клетки и клеточный дебрис (рис. 3, а). После автоматической

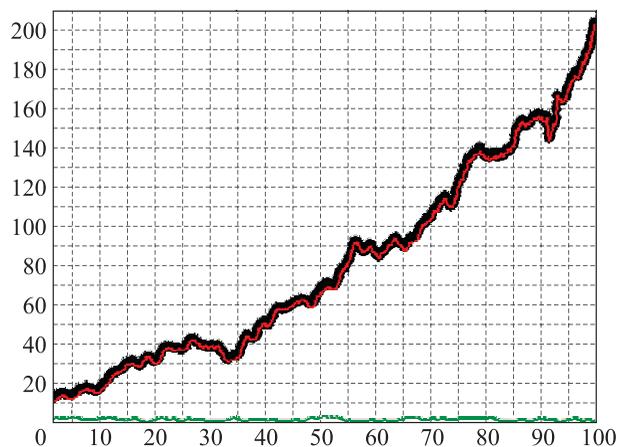


Рис. 4. Пролиферативная активность МСК. Красная и зеленая линии соответствуют количеству расплывшихся и делящихся клеток соответственно, черная линия – суммарное количество клеток; по оси абсцисс – время (ч), по оси ординат – количество клеток

обработки всех изображений с помощью пакета программ Cell-IQ Analyser подсчитано среднее значение митотического индекса на протяжении четырех дней непрерывного анализа пролиферирующих МСК. Для клеток, полученных от первого и второго пациента, среднее значение митотического индекса составляет 2,7 и 3,4 % соответственно, что указывает на пролиферацию МСК и подтверждается кривой увеличения количества клеток (рис. 4). Двигательную активность оценивали для 20 случайно выбранных клеток, для чего в программном обеспечении Cell-IQ Analyser отслеживали траекторию движения для каждой из них. Для анализа выбирались траектории тех клеток, которые за период трекинга не испытывали контактных взаимодействий с другими клетками (см. рис. 3, б) и, таким образом, явились следствием их внутренней активности, не зависящей от расположения других клеток. Вычисления характеристик подвижности МСК производили с использованием программы в пакете Mathematica 10, разработанной для обработки параметров двигательной активности остеобластов и хондробластов. Значение подвижности (скорость миграции клеток) МСК первого пациента составляет 42 мкм/ч (59 пикселей/час), второго – 38 мкм/ч (56 пикселей/час), что позволяет говорить об активном движении клеток (см. рис. 3, б).

Исследование остеогенного потенциала МСК человека проводили культивированием клеток в стандартной остеогенной среде [1]. С помощью фазово-контрастной микроскопии установлено, что количество веретенообразных клеток снижается, а число полигональных увеличивается визуально уже на третьи сутки инкубирования

в дифференцировочной среде. С увеличением срока культивирования МСК в остеогенной среде также возрастала активность щелочной фосфатазы, одного из основных маркеров остеогенной дифференцировки клеток. Это связано с участием фермента в формировании кристаллов гидроксиапатита во внеклеточном матриксе [17]. Интенсивность реакции на щелочную фосфатазу оценивали на 16–18-е сутки эксперимента, по интенсивности окрашивания она достигала максимальных значений в «костных бляшках», неравномерно образующихся в плотном монослое при длительном культивировании остеобластов. Завершение остеогенной дифференцировки созреванием остеобластов и формированием кальциевых депозитов внеклеточного матрикса подтверждается интенсивным окрашиванием ализариновым красным. В клеточных скоплениях, напоминающих «костные бляшки», плотность минерализации соединений кальция пропорциональна интенсивности красной окраски (см. рис. 1, г). Для подтверждения хондрогенной дифференцировки МСК культивируемые клетки иммуноцитохимически окрашивались альциановым синим. При созревании хондробласты начинают продуцировать межклеточный матрикс хрящевой ткани, который специфически окрашивался в синий цвет, от светло-голубого до темно-синего пропорционально толщине отложения хрящевого матрикса (см. рис. 1, д).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активные разработки тканеинженерных конструкций для регенерации тканей опорно-двигательного аппарата определяют повышенный интерес к исследованиям МСК. МСК, выделенные из костного мозга, остаются в центре внимания большинства исследований из-за наличия у них способности дифференцироваться в клетки хондро- и остеогенных типов тканей. В нашей работе показано, что аспиранты костного мозга пациентов с диспластическим коксартрозом являются полноценным источником МСК, которые удовлетворяют требованиям, определенным Международным обществом клеточной терапии. В экспериментах по длительному культивированию с визуальным контролем на аппарате Cell-IQ определены размеры и морфология типов клеток в популяции МСК, адгезия, экспрессия типичных поверхностных маркеров, проведена дифференцировка МСК по остеогенному и хондрогенному типу. Впервые оценены параметры подвижности МСК, включая траекторию движения, среднюю скорость, а также митотический индекс МСК при инкубировании на культуральном пластике.

МСК являются перспективными кандидатами для тканевой инженерии, с прицелом на регенерацию костной и хрящевой ткани. Полученные данные могут использоваться как контрольные параметры клеток при сравнении с аналогичными параметрами при заселении клетками различных «скаффолдов». Сравнение изученных характеристик клеток позволит оценить токсичность и биосовместимость «скаффолдов» различного происхождения и различных физико-химических свойств. Вычисление скорости заселения клетками объемных трехмерных «скаффолдов» позволит разработать методические подходы к достижению оптимальных показателей адгезии МСК, поддержанию их пролиферации и направленной дифференцировки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проводилось при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-29-04875) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования «Регенеративная медицина и клеточные технологии», организованного на базе АО «Инновационный медико-технологический центр (Медицинский технопарк)». Работа в части анализа двигательной активности клеток выполнена при поддержке бюджетного проекта ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» № 0324-2016-0003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Н.В., Бонарцев А.П., Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Харитоновна Е.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Белявский А.В. Культивирование мезенхимных стволовых клеток мыши на матриксах из поли-3-оксибутирата // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2015. (2). 114–119.
2. Кожевникова М.Н., Микаелян А.С., Старостин В.И. Молекулярно-генетический и иммунофенотипический анализ антигенного профиля, остеогенных и адипогенных потенциалов мезенхимальных стромальных клеток из печени зародышей и костного мозга половозрелых крыс // Цитология. 2009. 51. (6). 526–538.
3. Banfi A., Muraglia A., Dozin B., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Quarto R. Proliferation kinetics

and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy // *Exp. Hematol.* 2000. 28. (6). 707–715.

4. Bara J., Richards R.G., Alini M., Stoddart M.J. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following *in vitro* culture: implications for basic research and the clinic // *Stem Cells.* 2014. 32. 1713–1723.

5. Beyer Nardi N., da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006. (174). 249–282.

6. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // *Stem Cells.* 2001. 19. (3). 180–192.

7. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts // *Hum. Gene Ther.* 2010. 21. 1045–1056.

8. Da Silva Meirelles L., Caplan A.I., Nardi N.B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* 2008. 26. (9). 2287–2299.

9. 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. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* 2006. 8. (4). 315–317.

10. Dong Y., Chen X., Hong Y. Tissue-engineered bone formation *in vivo* for artificial laminae of the vertebral arch using beta-tricalcium phosphate bioceramics seeded with mesenchymal stem cells // *Spine.* 2013. 38. (21). 1300–1306.

11. Gimble J.M., Grayson W., Guilak F., Lopez M.J., Vunjak-Novakovic G. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration // *Front. Biosci.* 2011. 3. 69–81.

12. Horner C.B., Hirota K., Liu J., Maldonado M., Hyle Park B., Nam J. Magnitude-dependent and inversely-related osteogenic/chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells under dynamic compressive strain // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2016. doi: 10.1002/term.2332.

13. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* 2005. 7. (5). 393–395.

14. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review // *J. Nippon. Med. Sch.* 2009. 76. (2). 56–66.

15. Mizuno H. Adipose-derived stem and stromal cells for cell-based therapy: current status of preclinical studies and clinical trials // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010. 12. (4). 442–449.

16. Mosna F., Sensebe L., Krampere M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide // *Stem Cells Develop.* 2010. 19. (10) 1449–1470.

17. Di Maggio N. Bone marrow mesenchymal stem cell niches and regenerative medicine. Basel, 2010. 142 p.

18. Wu Y., Yang Z., Law J.B., He A.Y., Abbas A.A., Denslin V., Kamarul T., Hui J.H., Lee E.H. The combined effect of substrate stiffness and surface topography on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *Tissue Eng. Part A.* 2017. 23. (1-2). 43–54.

CULTIVATION AND CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE BONE MARROW OF THE PATIENTS WITH ORTHOPEDIC PATHOLOGY

Nataliya Mikhaylovna ASTAKHOVA^{1,2}, Anastasiya Viktorovna KOREL¹,
Konstantin Evgen'evich ORISHCHENKO³, Yaroslav Reingol'dovich EFREMOV^{3,4},
Gleb Aleksandrovich KUDROV¹, Irina Anatol'evna KIRILOVA¹

¹Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan of Minzdrav of Russia

630091, Novosibirsk, Frunze str., 17

²Innovative Medical Technology Center (Medical TechnoPark)

630091, Novosibirsk, Frunze str., 19a

³Institute of Cytology and Genetics of SB RAS

630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 10

⁴Novosibirsk State University

630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2

The article presents data on the cultivation and characteristics of mesenchymal stem cells (MSC) isolated from the bone marrow of patients with dysplastic coxarthrosis. Several morphological phenotypes were found in the fraction of adhesive MSC: spindle-shaped elongated cells, large flattened cells, and thin stellate cells in both samples of bone marrow. Immunophenotypic analysis showed that cells express surface antigens (CD90, CD73, CD105, CD45 and CD34), which are characteristic for typical stem cells. It was shown that the use of a new growth medium containing no components of animal origin for the cultivation of human MSC allowed to achieve confluence of the cell culture on the 16th–8th day of incubation without delaying the proliferative activity of the cells and without loss of ability to differentiate into chondro- and osteogenic types of tissues. Multipotency of MSC was confirmed by osteogenic and chondrogenic differentiation of cells, during prolonged cultivation of MSCs in induction media *in vitro*. The differentiation of MSC into osteoblasts was confirmed by immunocytochemical staining for alkaline phosphatase and alizarin red S. Specific differentiation of MSC in chondrogenic type was revealed by staining of cartilage deposits with alcian blue. For the first time, such characteristics of human MSC as: mitotic index, trajectory of cells migration and average speed of migration on culture plastics were determined. The mitotic index of actively proliferating MSC was from 2.7 to 3.4 % of the total cell number. The moving activity (speed of cell migration) was 38–42 $\mu\text{m}/\text{h}$. Thus, bone marrow aspirate from patients with orthopedic pathology is the source of stem cells that meet all the criteria for MSC as determined by the International Society of Cellular Therapy and can be used in regenerative therapy of bone and cartilage.

Key words: mesenchymal stem cells (MSCs), bone marrow, dysplastic coxarthrosis, mitotic index, speed of migration, differentiation, bone and cartilage regeneration.

Astakhova N.M. – candidate of biological sciences, senior researcher of experimental department, e-mail: N.Astakhova@niito.ru

Korel A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of experimental department, e-mail: akorel@niito.ru

Orishchenko K.E. – candidate of biological sciences, head of cell technologies sector, e-mail: OrishchenkoKE@icg.sbras.ru

Efremov Ya.R. – leading engineer of the center for microscopic analysis of biological objects, e-mail: yarex@bionet.nsc.ru

Kudrov G.A. – junior researcher of experimental department, e-mail: g16kud@gmail.com

Kirilova I.A. – doctor of medical sciences, leading researcher of experimental department, e-mail: irinakirilova71@mail.ru