

УДК 612.419-014.3:612.75

СКЕРОВАНЕ ХОНДРОГЕННЕ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ У МОНОШАРІ

О. В. Кучук

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини
НАМН України», Київ

E-mail: olkups@gmail.com

Отримано 22.05.2012

Клітини, отримані з кісткового мозку мишей лінії FVB, дослідили на здатність до утворення колоній *in vitro* та встановили відсотковий вміст колонієутворювальних клітин у зразках. За рівнем експресії поверхневих маркерів CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117, характерних для мультипотентних мезенхімних стромальних клітин, досліджувані клітини відповідають показникам цих клітин кісткового мозку дорослого організму. Проаналізовано й виокремлено основні компоненти, необхідні для хондрогенної спеціалізації клітин *in vitro*. Показана можливість диференціювання мультипотентних мезенхімних стромальних клітин в хондрогенному напрямку у вигляді моношару *in vitro*. Застосовано метод комбінованого фарбування фіксованих у моношарі клітин кісткового мозку, диференційованих у хондрогенному напрямку. Метод полягає у послідовному фарбуванні клітин альціановим синім та сафраніном О, що дає змогу побачити межі позаклітинного матриксу та показати, що він складається переважно із сульфатованих глікозаміногліканів, що є характерним для хрящової тканини.

Ключові слова: культура клітин, мультипотентні стромальні клітини, хондрогенез, скероване диференціювання.

Можливість отримувати *in vitro* спеціалізовані клітини з некомітованих попередників є зручною моделлю для вивчення процесів, які відбуваються в клітинах під час їх спеціалізації. Здатність мультипотентних мезенхімних стромальних клітин (МСК) кісткового мозку (КМ) диференціюватись у хондрогенному напрямку є одним із основних шляхів спеціалізації цих клітин.

Для дослідження процесів дозрівання клітин хрящової тканини і синтезу ними компонентів міжклітинної речовини було розроблено способи моделювання утворення хрящової тканини *in vitro*. Запропоновано низку методик для хондрогенного диференціювання МСК, відмінності яких полягають у різних складових середовища для культивування та їх концентраціях [1–5]. Згідно з переважною більшістю протоколів, хондрогенне диференціювання пропонують проводити у вигляді тривимірних культур, зокрема культури мікрмаси, що її утворюють центрифугуванням попередньо розмножених *in vitro* МСК у моношарі [6]; заселенням клітинами декальцинованих кісток [7] або полімерних матриксів [8, 9] тощо. Однак

для спостереження за змінами морфології клітин у динаміці та порівняння культур клітин з різних джерел корисним може бути диференціювання МСК у моношарі, особливості якого буде розглянуто в цій роботі.

Для забезпечення оптимальних умов диференціювання клітини культивують за високої щільності. Основними компонентами середовища для хондрогенного диференціювання, враховуючи дію їх на прогеніторні клітини, є трансформуючий фактор росту β (TGF- β) та інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1). Аскорбат є допоміжною складовою середовища і посилює дію факторів росту. Дексаметазон в умовах *in vitro* забезпечує швидку зміну експресії генів і, як наслідок, — морфофункціональних властивостей клітин. Для кращого розуміння вибору саме цих компонентів для індукції хондрогенезу *in vitro* далі буде більш докладно розглянуто їх вплив на некомітовані клітини.

Перед конденсацією прехондроцитарні мезенхімні клітини продукують позаклітинний матрикс, багатий на гіалуронан та колаген типу I, а також на колаген типу II. Позаклітинний матрикс взаємодіє з молеку-

лами адгезії клітин, щоб активувати внутрішньоклітинні сигнальні шляхи для ініціації переходу від хондропротекторів до хондроцитів. Молекули матриксу, такі як фібронектин та гіалуронова кислота, зв'язують фактори росту і діють як їхні резервуари. Після зв'язування з рецепторами поверхні мембрани фактори росту ініціюють сигнальний каскад регуляторних протеїнів у клітині, що виявляється у зміні її біологічної активності [10.].

Трансформуючий фактор росту β є одним з найбільш ранніх сигналів хондрогенної конденсації. Він стимулює синтез фібронектину, який, у свою чергу, регулює N-CAM. Синдекан — трансмембранний глікопротеїн — зв'язується з фібронектином та пригнічує синтез N-CAM, встановлюючи тим самим межі конденсації [11].

In vitro TGF- β , окрім хондрогенної індукції, може спричинити диференціювання МСК в напрямку гладеньких м'язів. У численних експериментах було виявлено залежність спрямованості диференціювання клітини від її оточення. Використовуючи техніку мікроділянок для контролю форми клітин та ступеня розпластування, було показано, що у МСК, які адгезувалися на мікроділянках, однак були обмежені в розпластуванні, активувалися гени хондрогенезу у відповідь на стимуляцію TGF- β , тоді як клітини, які не були обмежені в розпластуванні на субстраті, диференціювалися у гладенькі м'язи. Таким чином, структурні зміни в клітинах, які відбуваються упродовж морфогенезу, можуть відігравати безпосередню регуляторну роль у спрямуванні диференціювання стовбурових клітин [11–13]. Однак тільки структурних змін буває недостатньо для кінцевого визначення спрямованості спеціалізації клітин. Було показано, що за відсутності TGF- β МСК *in vitro* конденсуються без хондрогенного диференціювання [14].

Інсуліноподібний фактор росту 1 має хондропротекторну дію, стимулює хондроцити до підвищення синтезу позаклітинного матриксу, а також асоційований з активацією остеоцитів, оскільки є анаболічним фактором кісток. Цей невеликий високопроникний протеїн з високою подібністю молекулярної будови до інсуліну у високих концентраціях здатен активувати рецептори інсуліну, доповнюючи його ефекти [15, 16].

Синтетичний аналог гормону кори надниркових залоз — дексаметазон — має глюкокортикоїдну дію. Основним механізмом, який лежить в основі біологічної активності

глюкокортикоїдів (ГК), є регуляція експресії генів на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях. ГК виявляють свою біологічну активність за рахунок зв'язування з цитоплазматичними рецепторами всередині клітини-мішені й регулюють транскрипцію широкого спектра генів. Зокрема, ГК є сильними інгібіторами транскрипції гена колагенази [17].

Експериментально було показано, що аскорбат збільшує рівень експресії мРНК хондрогенних маркерів, включаючи колаген типу II та агрекани в хрящі телят. Також аскорбат збільшує рівень активності лужної фосфатази і експресію колагену типу X у хондрокитах курчат. Властивість аскорбату стимулювати раннє та пізніше диференціювання хондроцитів пов'язано з тим, що він є кофактором проліл- та лізилгідроксилаз під час синтезу та секреції стабільного потрійного спіралеподібного колагену, а також стимулює синтез глікозаміногліканів, які є складовими позаклітинного матриксу [18].

Оскільки з віком потенціал клітин до диференціювання знижується, а проліферація, а отже й старіння, клітин *in vitro* відбувається значно швидше, ніж *in vivo*, для експериментальних досліджень варто використовувати клітини ранніх пасажів (до 4–6) [12].

Метою цієї роботи було показати можливість хондрогенного диференціювання МСК кісткового мозку мишей у моношарі, відслідкувати морфологічні зміни клітин *in vitro*, показати зміну в експресії та відкладанні позаклітинного матриксу комітованими клітинами.

Матеріали і методи

Отримання культури МСК. Самців мишей лінії FVB віком 4 міс ($n = 10$) піддавали евтаназії шляхом цервікальної дислокації. Стегнові кістки виділяли в стерильних умовах, відмивали в 70% -му етанолі та 0,9% -му розчині NaCl. Епіфізи кісток зрізали, за допомогою інсулінового шприца кістковий мозок вимивали живильним середовищем RPMI-1640 (Sigma, США) і ресуспендували для одержання моноклітинної суспензії. Кількість живих ядровмісних клітин підраховували в камері Горяєва, з використанням 3% -го розчину оцтової кислоти з трипановим синім (табл. 1).

Клітини висаджували в культуральні флакони Cell+ (Sarstedt, Німеччина) з розрахунку $0,4 \cdot 10^6$ клітин/см² культуральної поверхні в повне живильне середовище, яке

складалося з RPMI-1640 з 15% фетальної сироватки телят (ФСТ), а також 1% L-glutamine і 1% PenStrep (все — Sigma-Aldrich, США). Середовище замінювали через 3 доби, а потім кожні 3–4 доби до отримання моношару.

Виявлення здатності до колонієутворення. Для оцінювання здатності МСК КМ до утворення колоній отриману суспензію висаджували аналогічно вищеописаній методиці, однак у концентрації $0,2 \cdot 10^6$ клітин/см² культуральної поверхні. Через 11–12 діб клітини фіксували холодним етанолом 96°, колонії фарбували 10% -м розчином азур-еозину. Підраховували кількість колоній, які склалися не менш як із 50 клітин. Ефективність клонування вираховували за формулою [19]:

$$EK = \frac{X}{Y} \times 100\%,$$

де X — кількість отриманих колоній, Y — кількість висаджених клітин (таблиця).

Субкультивування клітин. Після досягнення клітинами 85–90% конфлюентності проводили субкультивування культури. Кондиційоване середовище зливали, моношар промивали 1 мМ розчином версену і додавали 0,05% -й розчин трипсину-версену (Sigma-Aldrich, США) до зруйнування моношару. Дію ензиму інгібували, додаючи рівний об'єм повного живильного середовища, клітини збирали центрифугуванням при 200 g протягом 5 хв за кімнатної температури. Супернатант зливали, осад ресуспендували в повному живильному середовищі, кількість живих клітин підраховували в камері Горяєва за допомогою тесту з трипановим синім.

Фенотипування культур клітин за маркерами CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 здійснювали з використанням моноклональних антитіл до мембранних антигенів мишей, мічених флюорохромами, згідно з рекомендаціями фірми-виробника (Becton Dickinson, США). Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програми BD FACS Diva 6.1.

Хондрогенне диференціювання МСК *in vitro*. Для відтворення умов конденсації клітин перед комітуванням у хондроцитарному напрямку *in vivo*, а саме — зменшення площі адгезії до пластику та ущільнення міжклітинних контактів, клітини 1–3 пасажів культивували до отримання щільності моношару 90–95%.

Для індукції хондрогенезу середовище для культивування замінювали на середовище для хондрогенного диференціювання. Для приготування такого середовища послуговувались описаними раніше методиками [1, 2, 4, 5]. Основою середовища для хондрогенного диференціювання було DMEM-HG (Sigma, США) з 10% ФСТ, доповнене L-аскорбінової кислоти 2-фосфатом (50 мкг/мл), дексаметазоном (39 нг/мл), піруватом натрію (100 мкг/мл), TGF-β3 (10 нг/мл) та IGF-I (100 нг/мл). Заміну середовища проводили кожні 3–4 доби. Загалом клітини інкубували в середовищі для хондрогенного диференціювання протягом 21 доби. Під час спрямованого диференціювання клітини містилися в інкубаторі при температурі 37 °C, 5% CO₂ і зволоженої атмосфері.

Контрольна культура клітин перебувала в аналогічних умовах і її культивували в DMEM-HG з 10% ФСТ без додавання для індукції хондрогенезу.

Під час індукції хондрогенезу спостерігали за морфологічними змінами в культурах, робили мікрофотографії у різні терміни спеціалізації клітин.

Після 21 доби культури контрольних та експериментальних клітин промивали фосфатно-сольовим буфером (ФСБ), фіксували 2% -м холодним розчином формальдегіду протягом 25–30 хв, повторно промивали ФСБ. Зафіксований моношар клітин фарбували упродовж 30 хв при 37 °C 1% -м альціановим синім у 3% -й оцтовій кислоті (рН 2,5), який виявляє відкладання сульфатованих глікозаміногліканів [20] і є специфічним барвником на муцини [21], та протягом 5 хв за кімнатної температури 0,1% -м водним розчином сафраніну О для виявлення протеогліканів [1, 20]. Відомо, що інтенсивність забарвлення зразка сафраніном О прямо пропорційна вмісту протеогліканів у хрящовій тканині [22].

Результати та обговорення

Отримано популяції адгезивних фібробластоподібних клітин з кісткового мозку мишей. Проведено оцінювання їхньої здатності до утворення колоній та ефективність клонування (таблиця).

Розраховували значення середніх арифметичних величин (*M*), їх середньоквадратичне відхилення (*σ*) і похибку середньої (*m*). Для визначення сили зв'язку між кількістю вимитих з кістки моноядерних клітин та кількістю колонієутворювальних клітин у зразках використовували метод рангової

№ пп	Кількість отриманих моноядерних клітин з однієї кістки ($\times 10^6$ клітин/мл)	Кількість утворених колоній у перерахунку на 10^6 висаджених моноядерних клітин (шт.)	Ефективність клонування (%)
1	23,4	21,8	0,00218
2	26	7,2	0,00072
3	16,8	59,2	0,00592
4	13,9	12,8	0,00128
5	27,6	8	0,0008
6	13,8	19,4	0,00194
7	8,2	10	0,001
8	16,8	15,6	0,00156
9	18	59,4	0,00594
10	20,4	38,2	0,00382
$M \pm m$	$18,49 \pm 1,89$	$25,16 \pm 6,36$	$0,0025 \pm 0,00064$

кореляції Спірмена. Коефіцієнт кореляції (R) становив 0,22, що свідчить про слабкий зв'язок між цими показниками.

Після аналізу отриманих величин було встановлено, що вони підпорядковуються розподілу Пуассона (рідкісні події). Так, у середньому подія трапляється з частотою 1/40 000 (1 колонієутворювальна клітина на 40 000 ядровмісних клітин у зразку), межі коливання становлять від 1/17 000 до 1/125 000.

Ефективність клонування для клітин кісткового мозку мишей у середньому становила $0,0025 \pm 0,00064\%$, що збігається з даними літератури, згідно з якими кількість мультипотентних клітин у кістковому мозку, здатних утворювати колонії *in vitro*, становить 0,01–0,001% [23]. Фенотипуванням отриманих культур було виявлено особливості експресії низки поверхневих маркерів (рис. 1). Високий рівень експресії маркерів CD44, CD73 та CD90 є типовим для клітин з мультипотентними властивостями. Однак

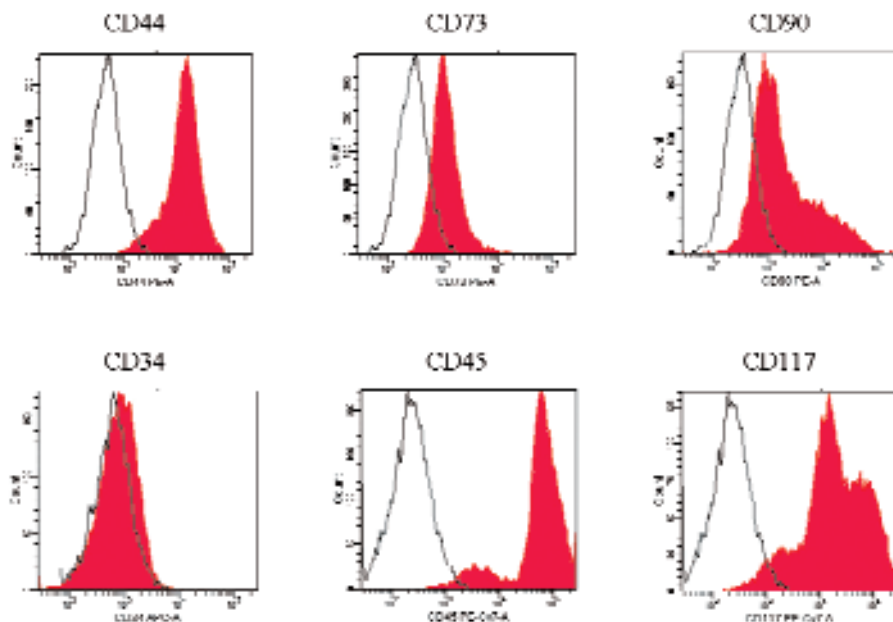


Рис. 1. Гістограми експресії поверхневих маркерів у культурі клітин кісткового мозку миші перед початком спрямованого диференціювання, 2-й пасаж: чорний контур — фоновий рівень флюоресценції клітин, червоний колір — рівень флюоресценції у зразку з додаванням моноклональних антитіл

експресія на клітинах CD45 та CD117 також зберігалася тривалий час. Як відомо, культура клітин кісткового мозку мишей досить гетерогенна за клітинним складом, і CD45 може бути виявлений на клітинах на ранніх пасажах [24].

Після внесення в культуру середовища для диференціювання протягом 24–72 год спостерігали конденсацію моношару в різних ділянках і утворення мікросфер, прикріплених до пластику розпластаними клітинами (рис. 2, А). Зменшення розмірів клітин, їх ущільнення і самоорганізація в об'ємну структуру забезпечують меншу розпластаність МСК на культуральній поверхні і можуть сприяти збільшенню кількості клітинних контактів, а разом з присутністю в середовищі TGF- β визначають хондрогенну спрямованість диференціювання культури. Водночас клітини в контрольних культурах лишалися розпластаними на поверхні культурального пластику. Протягом усього часу спостереження вони не утворювали мікросфер (рис. 2, Б), однак деяке відокремлення моношару можна було спостерігати у пристінкових ділянках культуральних чашок на 17-ту–21-шу добу, що пояснюється надмірною щільністю моношару.

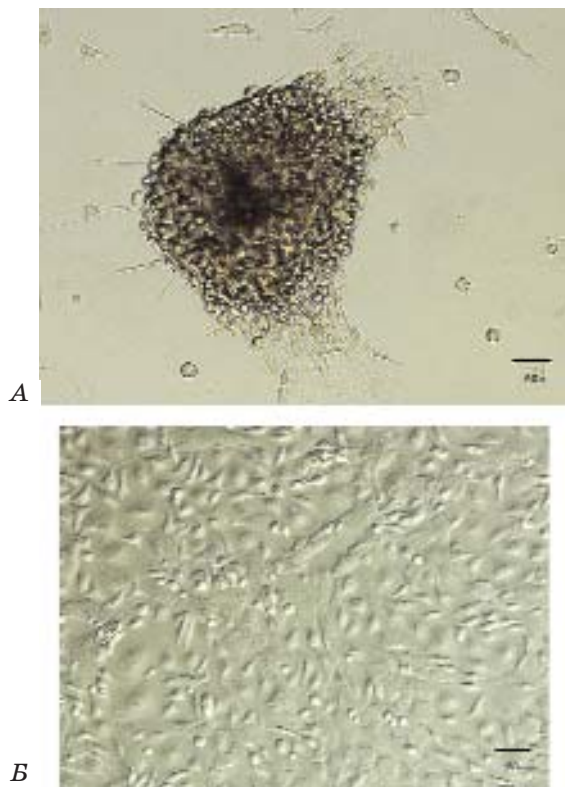


Рис. 2. Культура МСК кісткового мозку мишей ($\times 100$), фазовий контраст:

А — хондрогенна індукція *in vitro*, сконденсовані клітини; Б — контрольна культура клітин

Клітини в експериментальних культурах, які не було залучено до утворення конгломератів, набували округлої форми. До закінчення терміну диференціювання утворені сфери дещо збільшувались у діаметрі, а на пластику, вивільненому внаслідок конденсації клітин, з'являлися розпластані клітини. У деяких випадках проліферуючі клітини утворювали нещільний моношар навколо сфер.

Фарбування фіксованих у моношарі клітин альціановим синім (рис. 3, А) або сафраніном О (рис. 3, Б) давало інтенсивне забарвлення кожним із барвників. Це свідчить про те, що диференційовані *in vitro* МСК продукують муцини та протеоглікани, характерні для клітин хрящової тканини. Однак у разі фарбування цими самими барвниками контрольної культури клітин також отримували позитивне забарвлення.

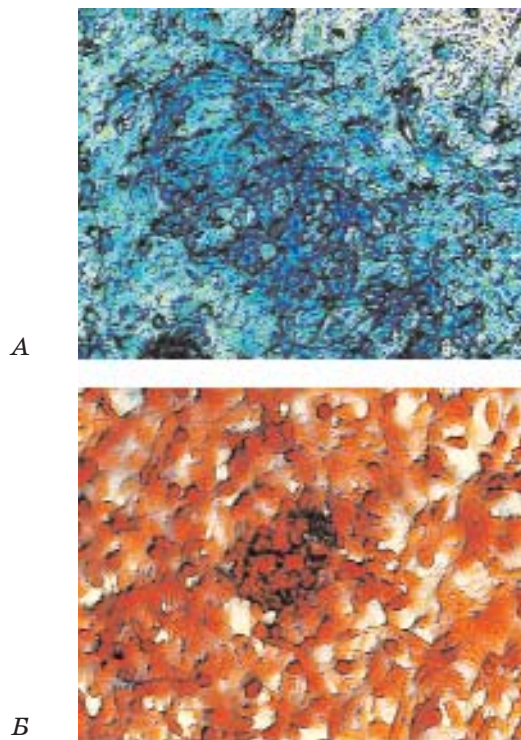


Рис. 3. Культура МСК кісткового мозку мишей, диференційованих у хондрогенному напрямку *in vitro*, 21 доба ($\times 100$):

А — забарвлення альціановим синім;
Б — забарвлення сафраніном О

У разі комбінованого застосування обох барвників у диференційованих культурах клітин спостерігали диференційне забарвлення: клітини зафарбовувались у червоний колір (сафранін О), позаклітинний матрикс — у блакитний (альціановий синій). Причому аналогічний розподіл забарвлення спостерігали як у розпластаних клітинах (рис. 4, А),

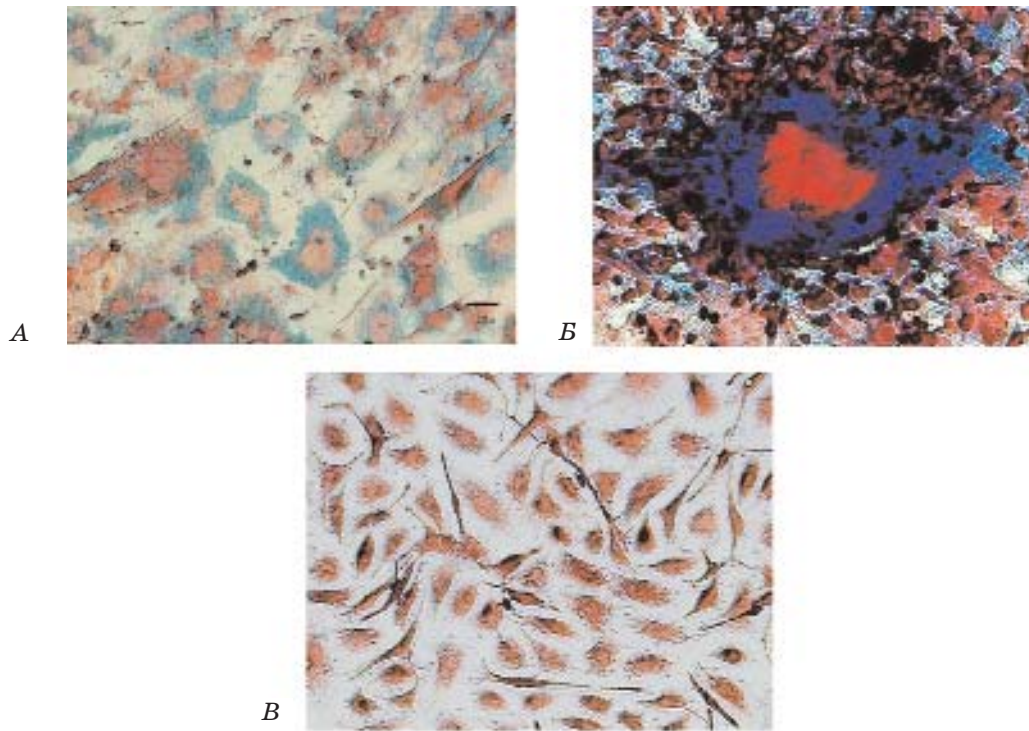


Рис. 4. Культура МСК кісткового мозку мишей, диференційованих у хондрогенному напрямку *in vitro*, 21 доба, комбіноване забарвлення альціановим синім і сафраніном О (×100):

А — диференційовані клітини в моношарі; Б — диференційовані сконденсовані клітини;
 В — контрольна культура клітини

так і в мікросферах (рис. 4, Б), тимчасом як фарбування фіксованого моношару недиференційованих МСК за аналогічним методом не дало розподілу забарвлення (рис. 4, В).

Таким чином, отримано культуру адгезивних клітин кісткового мозку мишей, здатну виживати і проліферувати в умовах *in vitro*. Досліджено її можливість утворювати колонії та проведено оцінювання ефективності клонування цих клітин. Було встановлено, що кореляція між кількістю отриманих з кістки моноядерних клітин та кількістю колонієутворювальних клітин у зразку відсутня. Одержані нами дані збігаються з показниками, одержаними і в інших лабораторіях, тому можна вважати, що кількість клітин, здатних утворювати колонії, у зразку є індивідуальним показником.

Проаналізовано характер експресії поверхневих антигенів цих клітин. За морфофункціональними ознаками та профілем експресії поверхневих антигенів вони відповідали характеристикам МСК.

Запропонований метод комбінованого фарбування альціановим синім та сафраніном О фіксованих культур клітин, диференційованих у хондрогенному напрямку, дав змогу довести хондрогенне спрямування спеціалізації клітин та визначити межі відкладання позаклітинного матриксу в окремих клітин. Окрім цього, було виявлено перерозподіл деяких компонентів хрящової тканини *in vitro*. Показано, що за конденсації цих клітин сульфатовані глікозаміноглікани відкладаються по периферії утвореного сфероїда, а протеоглікани — усередині конгломерату. Такий розподіл компонентів спостерігається і в хрящовій тканині, а отже клітини, утворюючи сфероїди за конденсації *in vitro*, здатні до просторової організації та перерозподілу функцій у межах конгломерату.

Автор висловлює подяку д-ру мед. наук, проф. Бутенко Г. М. і канд. мед. наук Кирику В. М. за надання допомоги у проведенні досліджень та статистичній обробці даних.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Li J., Mareddy S., Tan D.M., Crawford R. et al.* A minimal common osteochondrocytic differentiation medium for the osteogenic and chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells in the construction of osteochondral graft // *Tissue Engin.* — 2009. — V. 15, N 9. — P. 2481–2490.
2. *Nakahara M., Takagi M., Hattori T. et al.* Effect of subcultivation of human bone marrow mesenchymal stem on their capacities for chondrogenesis, supporting hematopoiesis, and telomea length // *Cytotechnology.* — 2005. — V. 47. — P. 19–27.
3. *Im G.-I., Jung N.-H., Tae S.-K.* Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients in late adulthood: the optimal conditions of growth factors // *Tissue Engin.* — 2006. — V. 12, N 3. — P. 527–536.
4. *Danisovic L., Lesny P., Havlas V. et al.* Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells // *J. Appl. Biomed.* — 2007. — V. 5. — P. 139–150.
5. *Matsuda C., Takagi M., Hattori T. et al.* Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocytes for construction of three-dimensional cartilage tissue // *Cytotechnology.* — 2005. — V. 47. — P. 11–17.
6. *Pei M., Luo J., Chen Q.* Enhance and maintain chondrogenesis of synovial fibroblasts by cartilage extracellular matrix protein matrilins // *Osteoarthr. Cartilage.* — 2008. — V. 16, N 9. — P. 1110–1117.
7. *Tan H., Yang B., Duan X. et al.* Morphological observation of mesenchymal stem cells cultured with allogenic decalcified bone matrix // *Biomaterials.* — 2009. — V. 30, N 21. — P. 3560–3566.
8. *Ghidoni I., Chlapanidas T., Bucco M. et al.* Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine // *Cytotechnology.* — 2008. — V. 58, N 1. — P. 49–56.
9. *Корж Н.А., Дедух Н.В.* Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации // *Ортоп. травматол. протезир.* — 2006. — № 1. — С. 77–84.
10. *Schwade N. D., Fowler J. J., Leach J.* The effects of TGF- β 3 modulation on scar tissue formation in the pig // *Wounds.* — 2000. — V. 12, N 2. — P. 32–39.
11. *Goldring M. B., Tsuchimochi K., Ijiri K.* The control of chondrogenesis // *J. Cell. Biochem.* — 2006. — V. 97. — P. 33–44.
12. *Gao L., McBeath R., Chen C. S.* Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin // *Stem Cells.* — 2010. — V. 28, N 3. — P. 564–572.
13. *Житников А. Я.* Морфологическая гетерохронность ростковых хрящей при развитии коротких и длинных костей свободных конечностей некоторых позвоночных // *Укр. морфол. альм.* — 2007. — Т. 5, № 2. — С. 32–37.
14. *Song L., Baksh D., Tuan R. S.* Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology // *Cytherapy.* — 2004. — V. 6, N 6. — P. 596–601.
15. *Vincent T. L., McLean C. J., Full L. E. et al.* FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer // *Osteoarthritis Cartilage.* — 2007. — V. 15. — P. 752–763.
16. *Tokunou T., Miller R., Patwari P. et al.* Engineering insulin-like growth factor-1 for local delivery // *FASEB J.* — 2008. — V. 22, N 6. — P. 1886–1893.
17. *Насонов Е.Л.* Общая характеристика и механизмы действия ГК // *Рус. мед. журн.* — 1999. — Т. 7, № 8. — С. 364–370.
18. *Altaf F. M., Hering T. M., Kazmi N. H. et al.* Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells // *Eur. Cell Mater.* — 2006. — V. 12. — P. 64–70.
19. *Фрешни Р.* Культура животных клеток. Методы: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 333 с.
20. *Nesic D., Schafer B., Herren S. et al.* Synovial fibroblasts, bone marrow MSC or chondrocytes combined with chondrogide for meniscal repair // *Abstracts of 52nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Chicago, Ill., USA, 18–22 March 2006.* — Paper No: 1029.
21. *Селиванов Е.В.* Красители в биологии и медицине: Справочник. — Барнаул: Азбука, 2003. — 40 с.
22. *Camplejohn K. L., Allard S. A.* Limitations of safranin O staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies // *Histochemistry.* — 1988. — V. 89. — P. 185–188.
23. *Сухих Г.Т., Спивак Н.Я., Малайцев В.В. и др.* Мезенхимальные стволовые и прогениторные клетки. Биологические свойства и перспективы использования. Обзор. // *Фиол. журн.* — 2007. — Т. 53, № 1. — С. 62–75.
24. *Ooi Y. Y., Ramasamy R., Vidyadaran S.* Mouse bone marrow mesenchymal stem cells acquire CD45-CD106+ immunophenotype only at later passages // *Med. J. Malaysia.* — 2008. — V. 63, Suppl A. — P. 65–66.

**НАПРАВЛЕННАЯ ХОНДРОГЕННАЯ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕ-
ТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ
В МОНОСЛОЕ**

О. В. Кучук

ГУ «Институт генетической и регенеративной
медицины НАМН Украины», Киев

E-mail: olkups@gmail.com

Исследовали способность клеток из костного мозга мышей линии FVB образовывать колонии *in vitro* и определили процентное содержание колониеобразующих клеток в образцах. По уровню экспрессии поверхностных маркеров CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117, характерных для мультипотентных стромальных стволовых клеток, полученные клетки соответствуют показателям этих клеток костного мозга взрослого организма. Проанализированы и выделены основные компоненты, необходимые для хондрогенной специализации клеток *in vitro*. Показана возможность дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в хондрогенном направлении *in vitro* в виде монослоя. Применяли метод комбинированной окраски фиксированных в монослое клеток костного мозга, дифференцированных в хондрогенном направлении. Метод заключается в последовательной окраске клеток альциановым синим и сафранином O, что дает возможность увидеть границы внеклеточного матрикса и показать, что он состоит преимущественно из сульфатированных гликозаминогликанов, что характерно для хрящевой ткани.

Ключевые слова: культура клеток, мультипотентные стромальные клетки, хондрогенез, направленная дифференцировка.

**GUIDED CHONDROGENIC
DIFFERENTIATION OF MICE BONE
MARROW MULTIPOTENT MESENCHYMAL
STROMAL CELLS IN A MONOLAYER**

O. V. Kuchuk

State Institute of Genetic and Regenerative
Medicine of National Academy of Medicine
of Ukraine, Kyiv

E-mail: olkups@gmail.com

Multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow of FVB mice for colonies forming activity were studied. The percentage of the colony forming units for every sample was measured. Also there were assessed levels of expression of the surface markers common for multipotent stromal cells: CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117. According to expression of these markers, the cells correspond to characteristics of adult multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. Components for chondrogenic differentiation were analyzed and the most essential were used in our researches. It was shown that multipotent mesenchymal stromal cells could be differentiated into chondrogenic direction *in vitro* as a monolayer. The combined dyeing technique was applied to the fixed monolayer of differentiated cells. The sequential use of alcian blue and safranin O demonstrated the distribution of glycosaminoglycans and proteoglycans which are typical for chondrogenic tissue in the cells and in the extracellular matrix.

Key words: cell culture, multipotent stromal stem cells, chondrogenesis, directed differentiation.