

Параллельное развитие остеогенной и эндотелиальной дифференцировок в сфероидах из стромальных клеток жировой ткани человека

Научный руководитель – Кошелева Настасья Владимировна

Ревокатова Дарья Петровна

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра эмбриологии, Москва, Россия

E-mail: revokatova.d@gmail.com

В настоящее время при создании биоэквивалентов для реконструкции дефектов костной ткани основным фактором, лимитирующим регенерацию, остается недостаток васкуляризации. Поэтому исследование *in vitro* взаимодействий остео и ангиогенеза в эмбриогенезе представляется актуальным. При совместном 2D культивировании эндотелиальных прогениторных клеток и остеогенных предшественников - мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), дифференцировка клеток в обоих направлениях начинается раньше. Однако в условиях трехмерной культуры данные процессы остаются малоизученными, несмотря на то, что компактная упаковка клеток внутри сфероидов способствуют образованию специфического микроокружения и более эффективной дифференцировке. Поэтому в данной работе были изучены сфероиды после индукции как в ангиогенном и остеогенном направлении, так и при единовременной индукции.

На 7, 14 и 21 сутки после индукции сфероиды анализировали методом иммуноцитохимии на наличие специфических маркеров ангиогенеза (Flk1, CD31), остеогенеза (остеокальцин, остеопонтин, коллаген-1), тканеспецифичного маркера жировой ткани адипонектина и маркера стромальных клеток виментина. Неиндуцированные сфероиды обладали способностью к частичному спонтанному остеогенезу и эндотелиальной дифференцировке с содержанием дифференцированных клеток ниже, чем при индукции. Добавление остеогенных и ангиогенных индукторов в отдельности и совместно приводило к параллельному развитию обеих клеточных дифференцировок, что выражалось в снижении жировых и стромальных клеток и повышении числа клеток, несущих маркеры эндотелия и остеобластов/остеоцитов. Двойная индукция значительно повышала синтез остеогенных маркеров на 7 сутки и, в особенности, на 14 сутки. Методом ПЦР в реальном времени во всех группах было выявлено снижение экспрессии генов, иницирующих дифференцировку ММСК в остеобласты, таких как BMP2, Runx2 и повышение экспрессии Osterix, регулирующего дифференцировку остеобластов в остеоциты, с максимальным уровнем экспрессии в группе с двойной индукцией на 21 сутки. Экспрессия маркера ранних этапов эндотелиальной дифференцировки CD34 достигала пика на 14 сутки в группе с двойной индукцией и снижалась к 21 суткам.

Таким образом, было установлено, что сфероиды из стромальных клеток жировой ткани формируют пространственный контекст для параллельного развития остеогенной и эндотелиальной дифференцировки мезенхимных клеток. При этом двойная индукция увеличивает количество клеток, вовлеченных в обе дифференцировки, стабилизируя процесс взаимодействия ангиогенеза и остеогенеза. Создание тканеинженерных конструкций с использованием сфероидов из ММСК жировой ткани человека, индуцированных в ангиогенном и остеогенном направлении открывает новые перспективы получения биоэквивалентов васкуляризованных фрагментов костной ткани *in vitro* для эффективного восстановления крупных дефектов костной ткани.

Исследование было поддержано фондом Грант Президента Российской Федерации (грант МК-3776.2019.4)