

Н. Н. Данилкович

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ В
ОТНОШЕНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
IN VITRO**

*Научные руководители: канд. мед. наук, доц. С. М. Космачева, зав. кафедрой
биоорганической химии, канд. мед. наук, доц. О. Н. Ринейская*

Кафедра биоорганической химии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

**РНИЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, г. Минск*

N. N. Danilkovich

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF PLATELET PREPARATIONS ON HUMAN
MESENCHYMAL STEM CELLS IN VITRO**

Tutors: Ph. D. in Medicine, Associate Professor S. M. Kosmacheva,

Head of Bioorganic chemistry department, Ph. D. in Medicine,

Associate Professor O. N. Rineyskaya

Department of Bioorganic chemistry,

Belarusian State Medical University, Minsk

**RSPC for Transfusion and Medical Biotechnology, Minsk*

Резюме. Исследована способность растворимых факторов тромбоцитов – лизата и лизата тромбоцитов, усиливать пролиферацию и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека *in vitro*. Оптимальные концентрации лизата и лизата тромбоцитов для культивирования и дифференцировки МСК человека составляют 2,5-5%.

Ключевые слова: мезенхимальные стовые клетки, остеогенная дифференцировка, тромбоциты.

Resume. We investigated the ability of soluble platelet-derived factors – platelet lysate and platelet release, to enhance proliferation and osteogenic differentiation of human bone-marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) *in vitro*. Optimal concentrations of platelet lysate and platelet release for the expansion and differentiation of hMSCs were 2,5-5%.

Keywords: mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, platelet.

Актуальность. Применение клеточных технологий и реагентов из тромбоцитов в составе биотрансплантатов для восстановления костных дефектов является перспективным решением в стимуляции репаративного остеогенеза в зоне дефекта. Тромбоциты содержат в своих α -гранулах свыше 300 биологически активных субстанций и представляют собой смесь ростовых, дифференцировочных, факторов адгезии, хемокинов и цитокинов, которые осуществляют локальный гемостаз, формируют местный очаг воспаления и регенерации, управляя хемотаксисом и пролиферацией клеток, ангиогенезом, остеогенезом, осуществляют ремоделирование поврежденных тканей. Учитывая естественную роль растворимых факторов тромбоцитов (РФТ) в репаративных процессах, представляет интерес их использования для экспансии и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в остеобласты *in vitro* при конструировании и приживлении костного трансплантата *in vivo* [1, 2].

Цель: разработать технологию получения препаратов с растворимыми факторами тромбоцитов и оценить их влияние на биологические эффекты мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека *in vitro*.

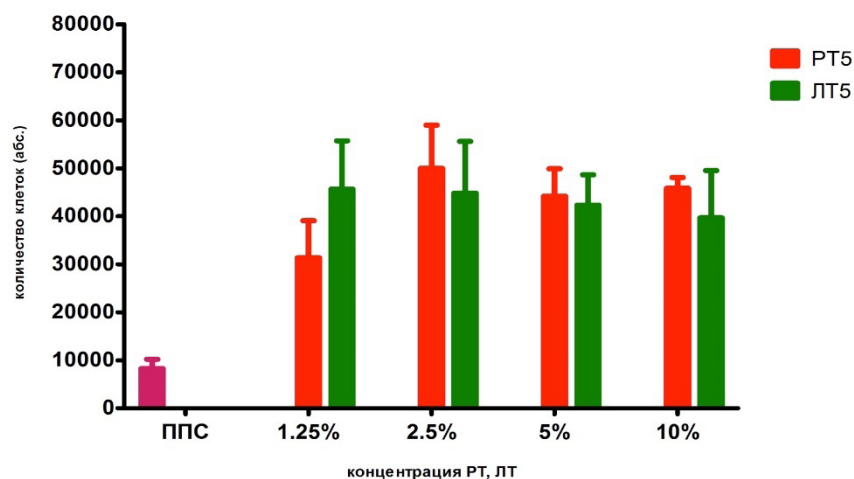
Задачи:

1. Отработать технологию получения препаратов с растворимыми факторами тромбоцитов.
2. Оценить влияние растворимых факторов тромбоцитов на пролиферацию и остеогенную дифференцировку МСК человека.
3. Определить уровень экспрессии маркеров остеогенеза МСК человека методом ПЦР в режиме реального времени.

Материал и методы. Получение растворимых факторов тромбоцитов (РФТ). Взвесь тромбоцитов получали из пула 8-10 доз концентрата тромбоцитов, заготовленных из донорской крови в РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, после удаления плазмы центрифугированием и доведением концентрации тромбоцитов до 5×10^9 /мл путем добавления питательной среды α -MEM (Sigma). Релизаты тромбоцитов (РТ) получали методом активации тромбином. Раствор тромбина добавляли к взвеси тромбоцитов из расчета 1 ед/мл и инкубировали в течение 20 минут при температуре плюс 20° С. Сформированный тромбоцитарный сгусток отжимали центрифугированием при 3500g в течение 20 мин. Отбирали супернатант, переносили в пробирку и повторно центрифугировали при 12000 об/мин. Лизаты тромбоцитов (ЛТ) получали методом шоковой заморозки. Суспензию замораживали при температуре минус 80°С. Через 24 часа пробирки помещали в термостат при 37°С до полной дефростации. Затем осаждали струму тромбоцитов центрифугированием в режиме 3500 g в течение 20 мин. Отбирали лизат в чистую пробирку и трижды центрифугировали в указанном режиме. Полученные реагенты фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм, затем 0,22 мкм, расфасовывали по 1 мл в пластиковые пробирки и хранили до использования при минус 20° С.

МСК костного мозга человека выделяли на градиенте плотности и культивировали в питательной среде альфа-МЕМ с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиками со сменой среды каждые 3-4 дня. Прилипшие к пластику МСК, снимали раствором 0,25% трипсин-ЭДТА, жизнеспособность оценивали с трипановым синим. В экспериментах для усиления пролиферации в культуру МСК вносили лизат и релизат тромбоцитов. Остеогенную дифференцировку МСК осуществляли путем добавления 10 мМ β -глицерофосфата, 50 мкг L-аскорбиновой кислоты и 0,1 мкМ дексаметазона в полную питательную среду. Оценку остеогенной дифференцировки проводили путем окрашивания индуцированных клеток на обнаружение фосфатов кальция (краситель Alizarin Red). Экспрессию мРНК щелочной фосфатазы и остеокальцина проводили на 21 день остеогенной дифференцировки клеток.

Результаты и их обсуждение. В исследованиях *in vitro* нами установлено, что РФТ увеличивают пролиферативную активность МСК человека (график 1).



Граф. 1 – Проллиферативная активность препаратов РФТ в отношении МСК человека *in vitro*

Препараты РТ и ЛТ оказывали выраженное 3-5 кратное стимулирующее действие на пролиферацию МСК человека во всех исследованных концентрациях. Оптимальными концентрациями для наращивания культуры МСК оказались 2,5-5% РТ и ЛТ. При увеличении концентрации РФТ до 10% не вызвало большего получения клеточной массы на 7-ой день культивирования.

Направленной дифференцировке в остеогенном направлении подвергались МСК 2-го пассажа при 90% конfluenceности монослоя. В остеогенную среду, содержащую β -глицерофосфат, аскорбиновую кислоту и дексаметазон, добавляли РТ и/или ЛТ в концентрации 1% - 5%. Культивирование проводили в течение 21 суток со сменой среды через 3-4 суток. Дифференцировочные факторы вносили в среду *ex temporo*.

По окончании остеогенной дифференцировки при окраске ализариновым красным в остеогенно-индуцированных МСК наблюдались единичные интенсивно окрашенные включения – депо кальция (рисунок 1). Выраженное накопление оссификатов кальция наблюдалось в остеогенно дифференцированных МСК при добавлении в среду культивирования 5% РТ или ЛТ по сравнению с классической остеогенной дифференцировкой. Добавление 2,5-5% РТ или ЛТ к культуре МСК без дифференцировочных факторов не приводило к образованию видимых оссификатов кальция, хотя и отмечалось наличие единичных включений оссификатов.

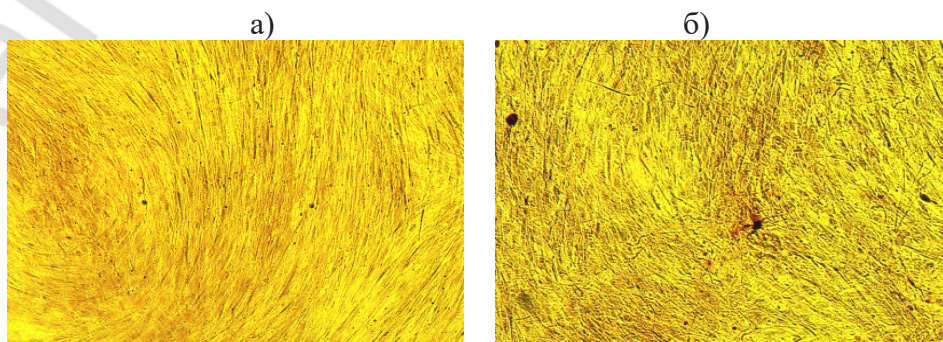


Рис. 1 – Остеогенная дифференцировка МСК КМ *in vitro*
 а) контрольные МСК, культивированные в культуральной среде; б) МСК, культивированные в остеогенной среде

Интенсивность образования оссификатов кальция в дифференцированных МСК зависела прямо пропорционально от концентрации РФТ, вносимых в дифференцировочную среду (рисунок 2) [3]:

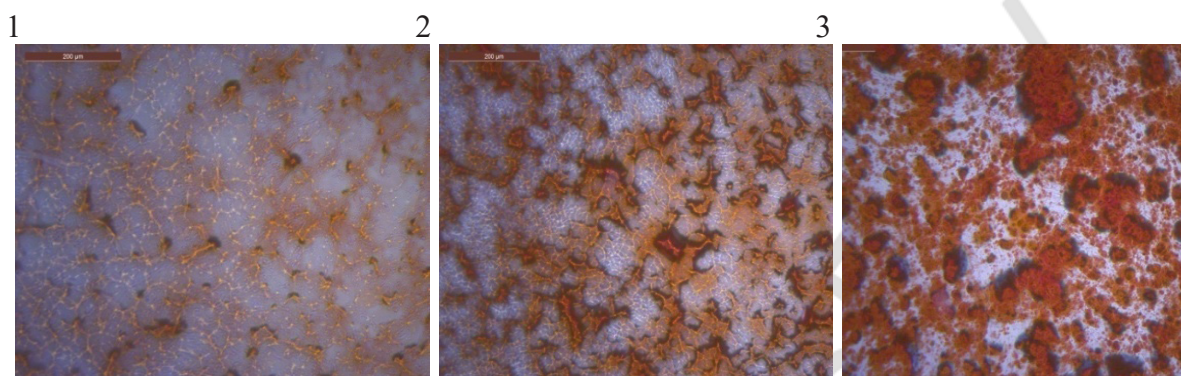


Рис. 2 – Образование оссификатов кальция в зависимости от концентрации добавляемых РФТ

Окраска ализариновым красным (x100): 1% (1), 2,5% (2), 5% (3)

Культура спонтанных и дифференцированных МСК, а также спонтанно и дифференцированные МСК с добавлением в среду культивирования 1- 5% РТ и ЛТ были протестированы на наличие уровня экспрессии специфических генов, детерминирующих остеогенную дифференцировку через 21 день культивирования.

Увеличение уровня экспрессии гена остеокальцина под действием РФТ наблюдали только при добавлении в среду культивирования ЛТ в концентрациях 2,5-5% (таблица 1).

Табл. 1. Уровень экспрессии гена остеокальцина (BGLAP) под влиянием РФТ в течение 21-го дня культивирования

№ п/п	Варианты	Экспрессия гена остеокальцина	
		РТ	ЛТ
1	МСК +ППС (контроль)	1,0	
2	Диф-ка	0,75 ± 0,2	
3	МСК + 1%	0,84 ± 0,2	1,81 ± 0,2
4	Диф-ка +1%	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,7
5	МСК + 2,5%	0,93 ± 0,2	3,13 ± 1,2
6	Диф-ка + 2,5%	1,43 ± 0,2	10,2 ± 13,1
7	МСК + 5%	1,6 ± 0,7	11,2 ± 7,0
8	Диф-ка + 5%	2,8 ± 1,1	14,2 ± 14

Примечание: ППС – полная питательная среда; РТ – релизат тромбоцитов; ЛТ – лизат тромбоцитов

Как видно из таблицы, при добавлении в остеогенную среду лизатов тромбоцитов в концентрации 2,5% увеличение уровня экспрессии составило 13,6 раз, а при 5% - 18,9 по отношению к контрольным дифференцированным МСК. Наблюдается также увеличение спонтанной дифференцировки недифференцированных клеток под

действием высокой концентрации (5%) ЛТ, которое составило 11,2 раза по отношению к МСК в ППС [4].

Выводы:

1 Отработаны протоколы получения растворимых факторов тромбоцитов методами шоковой заморозки и активации тромбином.

2 Исследована способность растворимых факторов тромбоцитов усиливать пролиферативную активность и остеогенную дифференцировку клеток. Оптимальные концентрации препаратов лизата и релизата тромбоцитов для культивирования и направленной дифференцировке МСК человека *in vitro* в полной питательной среде составляет 2,5-5%.

3 Полученные данные дают основание рассматривать препараты растворимых факторов тромбоцитов в качестве эффективного компонента при конструировании костных трансплантатов для замещения костных дефектов.

Литература

1. Растворимые факторы тромбоцитов и регенеративная медицина / М. П. Потапнев, А. А. Арабей, Г. Г. Кондратенко и др. // Здоровоохранение. – 2014. – № 9. – С. 32-40.

2. Плазма крови, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитами: получение, стандартизация, медицинское применение / М.П. Потапнев, С.И. Кривенко, В.Г. Богдан и др. // Здоровоохранение. – 2018. – №10. – С. 38-44.

3. Влияние релизата (releasate) тромбоцитов на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека / С. М. Космачева, Н. Н. Данилкович, А. В. Щепень и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – №4. – С. 210-216.

4. Application of bone-marrow mesenchymal stem cells and platelet-derived growth factors for human osteogenic graft engineering / N. N. Danilkovch, S. M. Kosmacheva, V. S. Derkachev et. al. // 5th international conference «Tissue Engineering and Regenerative medicine». – Berlin, 2016. – P. 54.