

Данилкович Н. Н.

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

Научный руководитель зав. кафедрой биоорганической химии, канд. мед. наук, доц.

Ринейская О. Н.

Кафедра биоорганической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

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*.

Цель: разработать технологию получения растворимых факторов тромбоцитов и оценить их влияние на биологические эффекты в отношении МСК костного мозга человека *in vitro*.

Материалы и методы. 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 (ЛТ) и релизат (РТ) тромбоцитов, полученные из концентрата тромбоцитов доноров крови, путем разрушения и активации тромбином клеток. Остеогенную дифференцировку МСК осуществляли путем добавления 10 мМ β -глицерофосфата, 50 мкг L-аскорбиновой кислоты и 0,1 мкМ дексаметазона в полную питательную среду. Оценка остеогенной дифференцировки проводили путем окрашивания индуцированных клеток на щелочную фосфатазу (набор Leukocyte Alkaline Phosphatase, Sigma) и обнаружение фосфатов кальция (краситель Alizarin Red). Экспрессию мРНК щелочной фосфатазы, остеопонтинина и остеокальцина проводили на 14 и 21 день остеогенной дифференцировки клеток.

Результаты и их обсуждение. В проведенных экспериментах *in vitro* показано, что культивирование МСК в присутствии РФТ приводит к увеличению скорости деления клеток. Так, за 7 дней культивирования МСК в присутствии 5% РТ или ЛТ кратность прироста составила 16,6 ($p=0.005$) и 14,4 ($p=0.003$) раза по сравнению с МСК, культивированными в полной питательной среде. В среде без добавления РФТ прирост МСК составил 2,6 раза к начальной концентрации клеток. Кроме этого, РФТ оказывают влияние на процесс дифференцировки МСК в остеогенном направлении. Интенсивность образования щелочной фосфатазы и фосфатов кальция остеогенно-индуцированными МСК прямо пропорционально зависела от концентрации вносимых в дифференцировочную среду РФТ (1 - 5%). При анализе влияния РФТ на экспрессию генов остеопонтинина и остеокальцина установлено, что при добавлении 5% ЛТ в дифференцировочную среду экспрессия мРНК остеопонтинина увеличивалась 4,7 раза ($p=0.04$), а мРНК остеокальцина – в 18,9 раза ($p=0.002$) по отношению к контрольным остеогенно дифференцированным МСК.

Выводы. Полученные данные позволяют на основании применения растворимых факторов тромбоцитов получить в достаточном количестве МСК костного мозга человека и усилить их остеогенную дифференцировку *in vitro* для клеточной терапии и тканевой инженерии.