

Е.М. Ермоленко, Ж.А. Ибрагимова, М.П. Потапнев, Т.С. Колесникова, С.Е. Семерихина
**Сравнительная характеристика индукции хондрогенной дифференцировки
мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* в условиях 2D и 3D культур.**
*Лаборатория биохимических методов исследования, Научно-исследовательская часть,
Белорусский Государственный медицинский университет*

Хондрогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток человека (МСК) требует условий, которые поддерживают клеточные взаимодействия, оптимальное применение ростовых факторов и адекватное микроокружение. При этом для практических целей важно наличие клеток, полученных как в условиях 2D (монослой) так и 3D (рост на носителе) культуры.

Цель работы: исследование эффективности хондрогенной дифференцировки МСК *in vitro* в условиях 2D и 3D культур.

Материалы и методы. Для хондрогенной дифференцировки МСК была использована культуральная среда, содержащая DMEM /F12, ITS (инсулин-трансферин -селеновая добавка), 1% раствор антибиотиков, 2 мМ L-глутамин, рекомбинантный человеческий TGF- β 3, L-аскорбат-2-фосфат, дексаметазон, L-пролин, пируват натрия.

Для создания 3D культуры были использованы матриксы, приготовленные на основе 2% альгината натрия, растворенного в 0,9% NaCl, в который были инсталлированы МСК после накопления клеточной массы в условиях 2D.

Результаты. В ходе исследования морфо-функциональных характеристик показано, что в течение 14 дней культивирования пролиферативная активность хондрогенно дифференцированных МСК в условиях трехмерной структуры снижена на 15% по сравнению с контролем.

Одновременно сравнивался фенотип контрольных (2D) и опытных (3D) образцов недифференцированных МСК. Все образцы были проинкубированы с антителами к CD44, CD29, CD90 и CD105. В условиях 2D культивирования количество МСК, позитивных по CD44 составляло $98,9 \pm 1,0\%$, по CD90 – $89,7 \pm 1,0\%$, по CD105 – $88,1 \pm 1,3\%$. Большинство клеток ($99,1 \pm 0,9\%$) окрашивалось с помощью FITC-меченых антител к CD29, что свидетельствует об их принадлежности к мезенхимальным стволовым клеткам. В ходе эксперимента было установлено, что МСК, культивируемые в трехмерной структуре, показали сходные результаты по анализу фенотипа. Так, в 3D культуре количество МСК, позитивных по CD44, составляло $98,7 \pm 1,1\%$, по CD90 – $89,2 \pm 1,0\%$, по CD105 – $87,7 \pm 1,2\%$, CD 29 – $98,6 \pm 1,2\%$.

Для оценки эффективности хондрогенной дифференцировки контрольные и опытные образцы исследовали на наличие экспрессии генетических маркеров хондрогенеза – агреккана, коллагена и Sox 9. Для этого на разных этапах эксперимента клетки извлекали из матриксов путем деполимеризации, выделяли РНК и проводили реакцию обратной транскрипции, после чего проводили ПЦР-анализ на наличие экспрессии генетических маркеров. Результаты анализа показали, что экспрессия агреккана, коллагена II и Sox 9 наблюдалась уже после 3-х суток культивирования клеток в дифференциальной среде и продолжалась весь период наблюдения до 13 суток независимо от условий культивирования 2D или 3D.

Выводы: Полимерный матрикс на основе альгината не оказывает влияния на хондрогенный дифференцировочный потенциал, но несколько снижает пролиферативную активность МСК.