

УДК 57.017.35

ВЛИЯНИЕ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ TGF- β 1, IGF-I, BMP-2 и BMP-4 НА ХОНДРОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ ЧЕЛОВЕКА

А.Д. Далина^{1,2}, А.Е. Мухамбетова¹, Н.Д. Батпенев³, Е.К. Раймагамбетов³,
В.Б. Огай¹

¹РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана,

²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Астана,

³Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, г. Астана
mirigia@mail.ru

В настоящее время мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделенные из синовиальной оболочки коленных суставов, представляют большой научный и практический интерес для регенеративной медицины и тканевой инженерии, поскольку они более эффективно участвуют в хондрогенезе и обладают более высоким пролиферативным и регенераторным потенциалом, чем МСК костного мозга и жировой ткани. Целью данной работы было изучить влияние ростовых факторов TGF- β 1, IGF-I, BMP-2 и BMP-4 на хондрогенную дифференцировку МСК синовиальной оболочки человека в условиях *in vitro*. В исследовании были использованы трансформирующий фактор роста TGF- β 1 (10 нг/мл), инсулино-подобный ростовой фактор IGF-I (500 нг/мл), костный морфогенетический белок BMP-2 (100 нг/мл) и BMP-4 (100 нг/мл). Для изучения влияния факторов роста на хондрогенную дифференцировку МСК культивирование проводили в 15 мл пробирках по 250 000 клеток до образования шариков, которые были проанализированы с помощью морфометрических и гистохимических методов.

Результаты наших исследований показали, что применение ростового фактора TGF- β 1 оказывало незначительный эффект на рост шариков, полученных во время хондрогенной дифференцировки МСК по сравнению с IGF-I, BMP-2 и BMP-4. Однако при изучении сочетанного влияния ростовых факторов было обнаружено, что комбинация TGF- β 1 и BMP-4 способна более значительно усилить рост хондриновых шариков, по сравнению с другими комбинациями. Под влиянием этих двух факторов образовывались шарики, содержащие большое количество коллагена и более зрелые хондроциты.

Таким образом, основываясь на наших данных, мы считаем, что TGF- β 1 и BMP-4 являются ключевыми ростовыми факторами, необходимыми для более эффективной дифференцировки МСК синовиальной оболочки человека в хондроциты. Полученные результаты также могут быть полезны для разработки клеточной терапии остеоартритов и хрящевых дефектов.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, факторы роста, дифференцировка, синовиальная оболочка, хондрогенез

Введение

Формирование хряща регулируется мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), которые пролиферируют и дифференцируются в хондроциты. МСК из синовиальной оболочки являются привлекательным источником клеток в отличие от других источников, благодаря своему уникально высокому уровню уридин-дифосфо-глюкозной (УДФГ) – дегидрогеназной активности и относительно выявленной экспрессией CD44, которые делают МСК из синовиальной оболочки более способными к хондрогенной дифференцировке.

Последовательное использование ростовых факторов было изучено в попытке резюмировать развитие событий, связанных с хондрогенезом [1]. Развитие соответствующих ростовых факторов, как трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), инсулиноподобный ростовой фактор I (IGF-I), костный морфогенетический белок – 2 (BMP-2) и BMP-4, было исследовано для определения их роли в *in vitro* хондрогенезе МСК [2-5]. Было показано, что TGF- $\beta 1$ стимулирует образование коллагена II типа и экспрессию протеогликана в МСК [4]. А IGF-I – фактор, экспрессирующий во время образования хряща в конденсирующих областях конечностей, в зрелых хрящах и синовиальной жидкости, показал регуляцию хондрогенеза МСК и анаболизм хрящевого матрикса [6]. BMP-2 и BMP-4, как и другие костные морфогенетические белки, играют важную роль в развитии хрящей и костей.

Исследование было проведено для проверки данных, что использование факторов роста TGF- $\beta 1$, IGF-I, BMP-2 и BMP-4 может заметно способствовать пролиферации хондрогенного потенциала МСК, выделенных из синовиальной оболочки. Целью нашего исследования было изучение влияния ростовых факторов TGF- $\beta 1$, IGF-I, BMP-2 и BMP-4 на МСК, выделенных из синовиальной оболочки, которые могли бы максимально увеличить хондрогенную дифференцировку клеток и в дальнейшем использованы для регенерации хрящевой ткани.

Материалы и методы

Выделение МСК из синовиальной оболочки человека

Забор синовиальной оболочки человека производили из коленного сустава в процессе артроскопических процедур в НИИ травматологии и ортопедии (г. Астана). Для выделения клеток синовиальная оболочка была обработана смесью антибиотиков-антимикотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В), измельчена на мелкие кусочки (1-2 мм³) и обработана с помощью 0,4% раствором коллагеназы II типа в течение ночи при 37°C. Полученная суспензия синовиальных клеток была профильтрована через нейлоновый фильтр (70 мкм), для дальнейшего удаления оставшихся фрагментов ткани. После отмывки фосфатно-солевым буфером (ФСБ), клетки ресуспендировали в среде Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, США), и определяли их количество, а также жизнеспособность клеток после окрашивания трипановым синим.

Культивирование МСК

Для получения первичной культуры МСК клетки культивировали в полной питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в CO₂ – инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Через 3 дня неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а фракцию адгезивных клеток культивировали до образования 80-90% конфлюэнтного монослоя. Пассирование клеток проводили используя TрупLE™ (Invitrogen, США), с интервалом 5-7 дней. Смена среды осуществлялась каждые 2-3 дня.

Окрашивание клеток кристаллическим фиолетовым

Клетки, выделенные из синовиальной оболочки человека, окрашивали кристаллическим фиолетовым. Монослой клеток дважды промывали ФСБ и фиксировали в течение 2 минут раствором этанола: ФСБ (1:1). Далее клетки инкубировали в течение 10 минут в свежеприготовленном этаноле. После удаления этанола чашки Петри с клетками высушивались и окрашивались 0,5% кристаллическим фиолетовым в течение 25 минут. Чашки Петри с окрашенными клетками промывали под проточной, а затем деионизированной водой. Образцы высушивали и анализировали с помощью инвертированного микроскопа.

Тест на образование колониеобразующих единиц

Выделенные клетки из синовиальной оболочки человека рассеивали на чашки Петри с расчетом 1 клетка/см² и культивировали на полной питательной среде DMEM в течение 14 дней при 37°C и 5% CO₂. По окончании культивирования клетки промывали ФСБ и окрашивали 0,5% раствором кристаллическим

фиолетовым в течение 5 минут. После двукратной отмывки ФСБ проводили подсчет образовавшихся колоний с использованием микроскопа (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Германия).

Иммунофлуоресцентный анализ

Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в ФСБ в течение 20 минут. После пятиминутной обработки тритоном X-100 клетки отмывали три раза в течение 5 минут ФСБ и добавляли 1% раствор альбумина в ФСБ на 1 час. Далее для определения маркеров МСК клетки инкубировали с первичными антителами против виментина, CD 90, CD 73, CD 105. Для приготовления необходимой концентрации антитела разводили в растворе, содержащем 1% альбумина и 0,1% Tween 20 в ФСБ. Инкубирование препаратов клеток в растворе антител проводили при 37°C в течение ночи. После трех пятиминутных отмывок в растворе 0,2% Tween 20 в ФСБ к препаратам клеток наносили раствор козьих антимышинных антител (1:500), конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 и инкубировали при 37°C в течение 45 минут. Клетки отмывали от раствора антител три раза по 5 минут 0,2% раствором Tween 20 в ФСБ. После высушивания под покровное стекло наносили по 10 мкл антивывгорающего раствора ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen, США). Препараты анализировали с помощью микроскопа (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Zen 2011.

Хондрогенная дифференцировка

После того как нарастили культуру МСК с достаточным количеством клеток, произвели направленную хондрогенную дифференцировку. Для этого использовали дифференцировочную среду, содержащую: дексаметазон 10^{-7} (Sigma, США), 1 Мм аскорбиновую кислоту (Sigma, США), 40 мкг/мл L-пролина (Sigma, США), инсулин-трансферин-селенит (OriCell™, США), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

Для изучения влияния факторов роста на хондрогенную дифференцировку МСК были использованы как в индивидуальном порядке, так и в комбинациях четыре фактора: TGF- β 1 (10 нг/мл), IGF-I (500 нг/мл), BMP-2 (100 нг/мл) и BMP-4 (100 нг/мл). Культивирование проводили в 15 мл пробирках по 250 000 клеток, центрифугировали при $500 \text{ g} \times 5$ минут, и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Смену среды производили 3 раза в неделю, на 21 день дифференцировки образовавшиеся шарики были зафиксированы 4% раствором параформальдегида (pH 7,4) при 4°C, в течение ночи. После чего образцы были окрашены 1% альциановым синим красителем для дальнейшего гистоморфологического анализа.

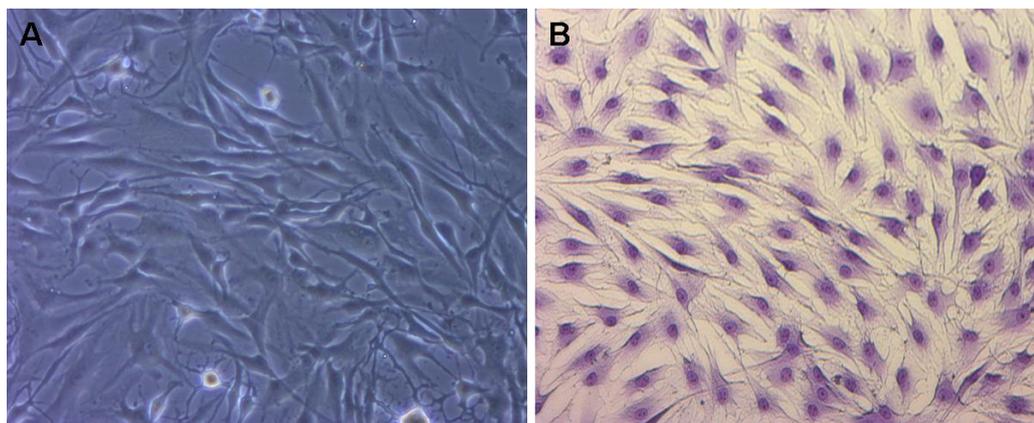
Гистохимический анализ

Шарики, образовавшиеся после хондрогенной дифференцировки, были зафиксированы в 4% параформальдегиде и заключены в эпоксидную смолу Epon 812. Полутолстые срезы (1 мкм) были нарезаны с помощью ультрамикротомы (Leica UC7, Австрия) и окрашены метиленовым синим, азуром-2 и основным фуксином. Анализ окрашенных образцов проводили с помощью светового микроскопа (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Zen 2011.

Результаты и обсуждение

Были выделены МСК из коленного сустава человека. В результате выделения средний выход клеток из 1 мг синовиальной оболочки составлял примерно 2×10^4 клеток.

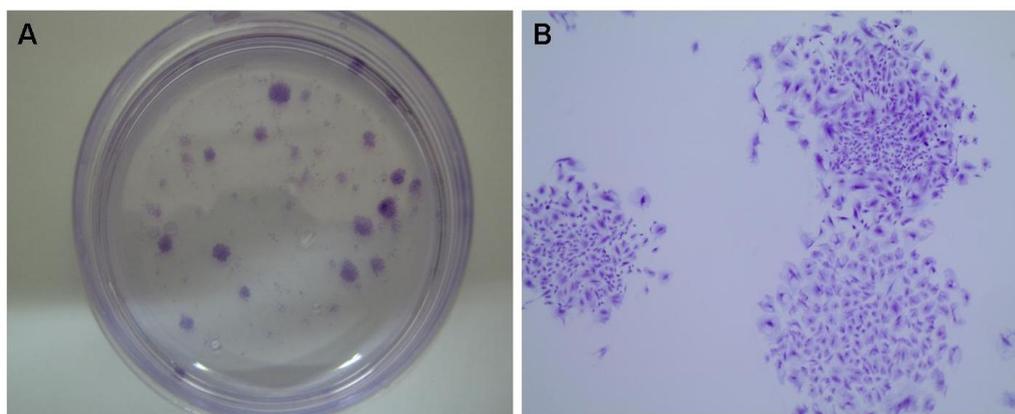
Морфологический анализ показал, что первичная культура МСК человека в основном представлена клетками с хорошо выраженной фибробластоподобной морфологией, имеющие круглое или овальное ядро с характерными двумя или более ядрышками (рисунок 1).



А – морфология живой культуры МСК под фазово-контрастным увеличением;
В – морфология МСК, окрашенная кристаллическим фиолетовым

Рис. 1. Морфология первичной культуры МСК человека

Было обнаружено, что эти клетки обладают высокой адгезивностью и способностью формировать фибробластные колониобразующие единицы, как показано на рисунке 2.



А – сформировавшиеся колонии МСК в чашке Петри; В – увеличенный снимок колоний МСК

Рис. 2. Результаты теста на образование колоний МСК

Для того, чтобы доказать, что полученная культура МСК человека (пассаж 3) является фенотипически гомогенной клеточной популяцией, был проведен иммунофлуоресцентный анализ с использованием антител к специфичным маркерам МСК: CD 90, CD 105 и CD 73 (рисунок 3). Результаты анализа показали, что клетки, выделенные из синовиальной оболочки коленного сустава человека, имеют фенотип МСК с достоверно выраженной экспрессией CD 90, CD 105 и CD 73.

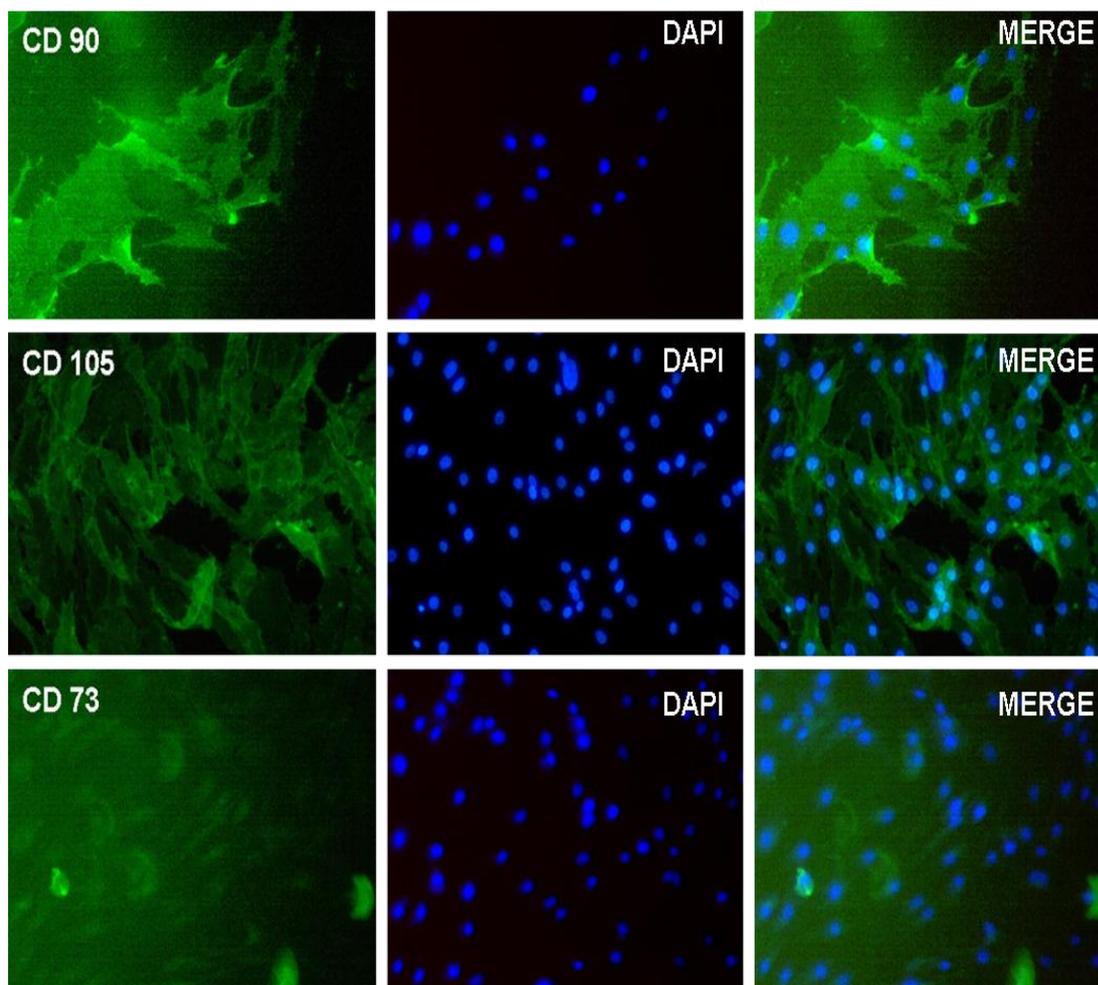


Рис. 3. Иммунофенотипирование МСК, выделенных из синовиальной оболочки коленных суставов человека (пассаж 3)

Во время исследования хондрогенного потенциала МСК, выделенных из синовиальной оболочки человека, мы изучили индивидуальное и комбинированное влияние четырех факторов роста: TGF- β 1, IGF-I, BMP-2 и BMP-4. Кроме того, в качестве сравнения также использовалась готовая дифференцировочная среда Stem PRO® (Stem PRO® Chondrogenesis Differentiation Kit) (Invitrogen, США), которая в своем составе уже содержит факторы роста: тромбоцитарный фактор роста – BB (PDGF-BB), фактор роста фибробластов-2 (FGF-2) и TGF- β 1 [7-8].

Таким образом, в исследуемой группе мы получили 8 образцов с различными комбинациями ростовых факторов, культивировавших в течение трех недель.

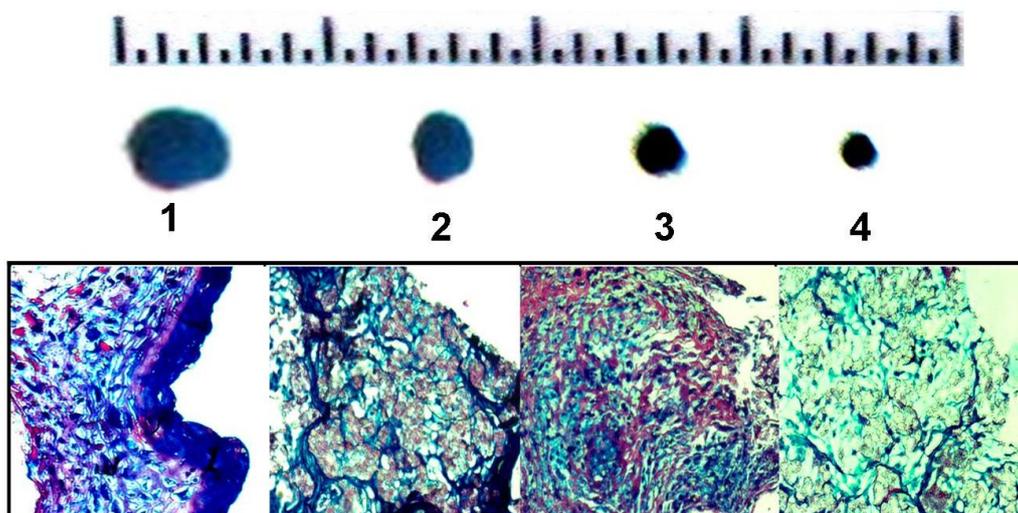
Хотелось бы отметить, что ранее подобное исследование проводилось зарубежными исследователями [9], однако ими были использованы комбинации трех факторов роста: TGF- β 1, IGF-I и FGF-2. Проведенные ими исследования показали, что комбинация TGF- β 1/FGF-2 увеличивает хондрогенез на уровень выше, чем индивидуальное использование TGF- β 1. Кроме того, предварительная обработка TGF- β 1/IGF-I/FGF-2 может значительно повысить пролиферацию МСК, из синовиальной оболочки.

Были использованы костные морфогенетические белки BMP-2 и BMP-4, т.к. они выполняют большое значение в развитии хрящевой и костной ткани. Причиной выбора TGF- β 1, как одного из факторов роста, послужило то, что он играет главную роль в процессе хондрогенеза [10, 11]. Известно, что изоформы TGF- β 1 могут регулировать мезенхимальную плотность – критическое значение для дифференцировки хряща. Безусловно, в бессывороточной среде, предварительно обработанной комбинацией ростовых факторов, включая TGF- β 1, инициировалась пролиферация и детерминация МСК исключительно в хондрогенном направлении [12-15]; в конечном итоге клетки дифференцировались в хондроциты.

В результате хондрогенной дифференцировки были получены шарики размером от 0,5 мм до 2 мм, в зависимости от комбинации факторов роста (рисунок 4). По данным гистологического исследования во

всех образцах была выявлена хондрогенная дифференцировка с частичным образованием коллагена, что свидетельствует о формировании хрящевой ткани.

Данные дифференцировочного теста показали, что применение ростового фактора TGF- β 1 оказывало незначительный эффект на рост шариков, полученных во время хондрогенной дифференцировки МСК по сравнению с IGF-I, BMP-2 и BMP-4. Однако при изучении сочетанного влияния ростовых факторов было обнаружено, что комбинация TGF- β 1 и BMP-4 способна более значительно усилить рост хондриновых шариков, по сравнению с другими комбинациями. Под влиянием этих двух факторов образовывались шарики, содержащие большое количество коллагена и более зрелые хондроциты. Немного хуже результат показал с использованием готовой дифференцировочной среды Stem PRO, размер образовавшихся шариков оказался меньше, чем TGF- β 1/BMP-4, однако и там наблюдалась картина хондрогенеза.



1 - с добавлением TGF- β 1 + BMP-4; 2 - дифференцировочная среда Stem Pro; 3 - с добавлением TGF- β 1 + BMP-2; 4 - с добавлением TGF- β 1 + IGF-I. Масштабная шкала 0,5 мм.

Рис. 4. Морфометрический и гистохимический анализ образовавшихся хондрогенных шариков

Выводы

Таким образом, на основании нашего исследования мы считаем, что ключевыми факторами роста, влияющими на дифференцировку МСК, выделенных из синовиальной оболочки, является комбинация TGF- β 1/BMP-4, которая в дальнейшем может быть использована для регенерации хрящевой ткани.

Литература

1. Pei M., Seidel J., Vunjak-Novakovic G. and Freed L.E. (2002a) Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 294:149–154.
2. Lennon D.P., Haynesworth S.E., Young R.G., Dennis J.E. and Caplan A.I. (1995) A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 219:211–222.
3. Trippel S.B. (1995) Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 43:129–132.
4. Yamaguchi A. (1995) Regulation of differentiation pathway of skeletal mesenchymal cells in cell lines by transforming growth factor-beta superfamily. *Semin Cell Biol* 6:165–173.
5. Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M. and Yoo J.U. (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265–272.
6. Martel-Pelletier J., Di Battista J.A., Lajeunesse D. and Pelletier J.P. (1998) IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res* 47:90–100.
7. Barbero A., Plorgert S., Heberer M. and Marti I. (2003) Plasticity of clonal population of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 48, 1315-1325.
8. Barbero A., Grogan S.P., Schafer D., Heberer M., Mainil-Varlet P. and Martin I. (2004) Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 476-484.
9. Pei M. He F., Vunjak-Novakovic G. (2008) Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. *Differentiation* (2008) 76:1044–1056.
10. Serra R., Johnson M., Filvaroff E.H., LaBorde J., Sheehan D.M., Derynck R. and Moses H.L. (1997) Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol* 139:541–552.
11. Dunker N., Schmitt K. and Kriegelstein K. (2002) TGF-beta is required for programmed cell death in interdigital webs of the developing mouse limb. *Mech Dev* 113:111–120.
12. Mackay A.M., Beck S.C., Murphy J.M., Barry F.P., Chichester C.O. and Pittenger M.F. (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4:415–428.
13. Chimal-Monroy J. and Diaz de Leon L. (1999) Expression of Ncadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations. *Int J Dev Biol* 43:59–67.
14. Pittenger M.F., Mosca J.D. and McIntosh K.R. (2000) Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 251:3–11.
15. Sekiya I., Vuoristo J.T., Larson B.L. and Prockop D.J. (2002) In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4397–4402.

Түйін

Қазіргі таңда тізе буынының синовиалды қабықшасынан бөлініп алынған мезенхималды бағаналы жасушалары (МБЖ), регенеративті медицина мен тіндік инженерия үшін үлкен ғылыми және тәжірибелік қызығушылығын танытып отыр. Май тіні мен жілік майының МБЖ қарағанда, олар хондрогенезге нәтижелі қатысады және жоғары пролиферативті, регенераторлы мүмкіндікке ие. Бұл жұмыстың мақсаты, TGF- β 1, IGF-I, BMP-2 және BMP-4 өсу факторларының *in vitro* жағдайында, адамның синовиалды қабықшасының МБЖ хондрогенді дифференциалдануына әсерін зерттеу болып табылады. Зерттеуде, трансформациялаушы өсу факторы TGF- β 1 (10 нг/мл), инсулин тәрізді өсу факторы IGF-I (500 нг/мл), морфогенетикалық сүйек ақуызы BMP-2 (100 нг/мл) және BMP-4 (100 нг/мл) пайдаланылды. МБЖ хондрогенді дифференциалдануына өсу факторларының әсерін зерттеу үшін, 250 000 жасушадан 15 мл түтікте түйіршіктердің түзілуіне дейін өсіріліп, морфометриялық және гистохимиялық әдістердің көмегімен талданды.

Біздің зерттеуіміздің нәтижелері, хондрогенді дифференциалануы кезінде алынған МБЖ түйіршіктерінің өсуіне IGF-I, BMP-2 және BMP-4 салыстырғанда, TGF- β 1 өсу факторының әсері болмашы екенін көрсетті. Бірақ, өсу факторларының үйлесімді әсерін зерттеу кезінде TGF- β 1 және BMP-4 қисындасуы басқаларымен салыстырғанда, хондронды түйіршіктердің өсуін бірталай жоғарылауына қабілетті екені анықталды. Осы екі факторлардың әсерінен, құрамында көп мөлшерде коллаген және жақсы жетілген хондроциттері бар, түйіршіктер түзілді.

Осылайша, біздің мәліметтерімізге сүйене отырып, адамның синовиалды қабықшасының МБЖ-ның хондроциттерге аса нәтижелі дифференциалдануына TGF- β 1 және BMP-4 негізгі өсу факторлары қажет болып табылады. Сонымен қатар, алынған нәтижелер шеміршек ақауының және остеоартриттің жасушалық терапиясын өңдеу үшін маңызды.

Кілтгі сөздер: Мезенхимальді бағаналы жасушалар, өсу факторлары, дифференциалдау, синовиалды қабықша, хондрогенез.

Summary

Currently mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from synovial membrane of knee-joint present a great scientific and practical interest for regenerative medicine and tissue engineering. Since they participate more effectively in chondrogenesis and have a higher proliferative and regenerative potential in comparison to MSCs from bone marrow and adipose tissue. The aim of this study was to investigate the influence of growth factors TGF- β 1, IGF-I, BMP-2 and BMP-4 on the *in vitro* chondrogenic differentiation of human synovial membrane MSCs.

In this research we use transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1, 10 ng/ml), insulin-like growth factor I (IGF-I, 500 ng/ml), bone morphogenic proteins BMP-2 (100 ng/ml) and BMP-4 (100 ng/ml). To study the influence of these growth factors on chondrogenic differentiation, 250 000 MSCs were cultured in 15 ml centrifuged tubes for pellet formation which then were evaluated by morphometric and histochemical methods.

Our results showed that in comparison to IGF-I, BMP-2 and BMP-4, an application of TGF- β 1 gives nonsignificant effect on growth of pellets formed during chondrogenic differentiation of MSCs. However, having studied combined effects of growth factors we observed that TGF- β 1 and BMP-4 were able to significantly promote growth of chondrogenic pellets in comparison with other combination of growth factors. The pellets formed under influence of TGF- β 1 and BMP-4 contained large amount of collagen and mature chondrocytes.

Thus, based on our results we suggest that TGF- β 1 and BMP-4 are key growth factors required for more effective differentiation of human synovial membrane MSCs into chondrocytes. Moreover, these data also may be useful for development for new approaches of stem cell therapy in osteoarthritis and cartilage defects.

Keywords: mesenchymal stem cells, growth factors, differentiation, synovial membrane, chondrogenesis.