

УДК 616.12-005.4:611.018.26:611.018.4
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-1-86-95>

Остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток эпикардиальной жировой ткани у пациентов с ишемической болезнью сердца

Учасова Е.Г.¹, Дылева Ю.А.¹, Слесарева Т.А.^{1,2}, Белик Е.В.¹,
Понасенко А.В.¹, Великанова Е.А.¹, Матвеева В.Г.¹, Двадцатов И.В.¹,
Тарасова О.Л.², Груздева О.В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ)

Россия, 650002, г. Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, 6

² Кемеровский государственный медицинский университет (КемГМУ)

Россия, 650000, г. Кемерово, Ворошилова, 22а

РЕЗЮМЕ

Цель. На основе получения профиля генов – маркеров остеогенеза – оценить остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток (МСК) эпикардиальной жировой ткани (ЭЖТ) у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца.

Материалы и методы. В МСК ЭЖТ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени определяли уровни экспрессии генов *RUNX2* (ген, кодирующий транскрипционный фактор RUNX), *BGLAP* (ген, кодирующий остеокальцин OCN), *SPP1* (ген, кодирующий остеоопонтин OPN), *SP7* (ген, кодирующий Osterix). С помощью иммуофлуоресцентного окрашивания в супернатанте культивируемых МСК определяли количество белка RUNX2, OCN, OPN и Osterix.

Результаты. Установлено, что экспрессия RUNX2 в клетках, культивированных в среде с остеоиндукторами, была в 1,88 раза выше, чем в недифференцированных МСК ($p = 0,012$). Уровень белка RUNX также был выше в дифференцированной культуре клеток ($p < 0,05$). Аналогичные результаты были получены в отношении уровня экспрессии мРНК *SPP1* ($p = 0,012$). Экспрессия *BGLAP* не отличалась в дифференцированных и недифференцированных культурах МСК так же, как уровень экспрессии гена *SP7* в клетках с остеобластной средой и без нее. Стоит отметить, что методом иммуофлуоресцентной окраски нами не выявлено различий в экспрессии Osterix и OCN между культурами дифференцированных и недифференцированных клеток.

Заключение. МСК ЭЖТ имеют остеогенный потенциал, что проявилось экспрессией генов остеогенеза как дифференцированных, так и недифференцированных МСК. Увеличение уровня экспрессии мРНК *SPP1* и *RUNX2* на 15-е сут культивирования с остеобластной средой свидетельствует о том, что изучаемые нами клетки являются преостеобластами и находятся на стадии синтеза внеклеточного матрикса.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, ишемическая болезнь сердца, гены остеогенеза, кальцификация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0002 (период выполнения 2022–2026 гг.) «Разработка инновационных моделей управления риском развития болезней системы кровообращения с учетом коморбидности на основе изучения фундаменталь-

ных, клинических, эпидемиологических механизмов и организационных технологий медицинской помощи в условиях промышленного региона Сибири».

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на использование биологического материала в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол № 12 от 20.03.2023).

Для цитирования: Учасова Е.Г., Дылева Ю.А., Слесарева Т.А., Белик Е.В., Понасенко А.В., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Двадцатов И.В., Тарасова О.Л., Груздева О.В. Остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток эпикардальной жировой ткани у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Бюллетень сибирской медицины*. 2025;24(1):86–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-1-86-95>.

Osteogenic potential of mesenchymal stem cells of epicardial adipose tissue in patients with coronary heart disease

Uchasova E.G.¹, Dyleva Yu.A.¹, Slesareva T.A.^{1,2}, Belik E.V.¹,
Ponassenko A.V.¹, Velikanova E.A.¹, Matveeva V.G.¹, Dvadtsatov I.V.¹,
Tarasova O.L.², Gruzdeva O. V.^{1,2}

¹ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases Federal State Budgetary Institution 6, Blvd. named after academician L.S. Barbarasha, Kemerovo, 650000, Russian Federation

² Kemerovo State Medical University
22a, Voroshilov Str., Kemerovo, 650000, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To assess the osteogenic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) of epicardial adipose tissue (EAT) in patients with stable coronary heart disease based on obtaining gene profiles (osteogenesis markers).

Materials and methods. In EAT MSCs, the expression levels of the *RUNX2* (RUNX transcription factor encoding gene), *BGLAP* (osteocalcin encoding gene), *SPP1* (osteopontin encoding gene), *SP7* (Osterix encoding gene) genes were determined using real-time polymerase chain reaction (PCR). Using immunofluorescence staining, the amount of RUNX2, osteocalcin, osteopontin, and Osterix proteins was determined in the supernatant of cultured MSCs.

Results. It was found that the expression of *RUNX2* in cells cultured in a medium with osteoinducers was 1.88 times higher than in undifferentiated MSCs ($p = 0.012$). The level of *RUNX2* protein was also higher in a differentiated cell culture ($p < 0.05$). Similar results were obtained regarding the level of *SPP1* mRNA expression ($p = 0.012$). *BGLAP* expression did not differ between differentiated and undifferentiated MSC cultures. The level of *SP7* gene expression did not differ in cells either with or without an osteoblastic medium. It is worth noting that using immunofluorescence staining, there were no differences detected in the expression of Osterix and OCN between cultures of differentiated and undifferentiated cells.

Conclusion. It was found that EAT MSCs have osteogenic potential, which was manifested by the expression of osteogenesis genes in both differentiated and undifferentiated MSCs. The increase in the expression level of *SPP1* and *RUNX2* mRNA on the 15th day of cultivation with osteoblastic medium indicates that the studied cells are preosteoblasts and are at the stage of extracellular matrix synthesis.

Keywords: mesenchymal stem cells, adipose tissue, coronary heart disease, osteogenesis genes, calcification

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out within the framework of the No. 0419-2022-0002 Development of Innovative Models for Managing the Risk of Developing Diseases of the Circulatory System with regard to Comorbidity Based on the Study of Fundamental, Clinical, Epidemiological Mechanisms and Organizational Technologies of Medical Care in the Industrial Region of Siberia fundamental subject (implementation period 2022–2026) of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent for the use of biological material in a scientific study. This study was approved by the local ethics committee of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (protocol No. 12 of March 20.03.2023).

For citation: Uchasova E.G., Dyleva Yu.A., Slesareva T.A., Belik E.V., Ponasenko A.V., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Dvadsatov I.V., Tarasova O.L., Gruzdeva O.V. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells of epicardial adipose tissue in patients with coronary heart disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2025;24(1):86–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-1-86-95>.

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз и связанная с ним патология – ишемическая болезнь сердца (ИБС), цереброваскулярные заболевания занимают первое место среди причин смерти в экономически развитых странах, несмотря на огромные успехи, достигнутые в их лечении. Одной из распространенных патологий, сопровождающих ИБС, является кальцификация коронарных артерий [1]. Несмотря на то, что сосудистая кальцификация была описана как форма внескелетного окостенения более 100 лет назад, на сегодняшний день доказано, что процесс кальцификации представляет собой строго регулируемый процесс. Его стадии развития аналогичны костному морфогенезу, включая экспрессию основных проosteогенных факторов, таких как остеокальцин, остеопротегерин, остеоопонтин и других маркеров [2]. Точные механизмы патогенеза кальцификации коронарных артерий до сих пор не ясны.

Долгое время считалось, что как минимум четыре типа клеток могут приводить к кальцификации сосудов: 1) перициты в микрососудах; 2) перицитоподобные кальцинирующие сосудистые клетки в интимае аорты; 3) гладкомышечные клетки в меди; 4) миофибробласты в адвентиции. Наряду с резидентными клетками циркулирующие клетки, в том числе и МСК костного мозга, способны мигрировать в стенку сосуда и вносить свой вклад в кальцификацию [3, 4]. Однако источником мезенхимальных стволовых клеток (МСК) может быть и жировая ткань (ЖТ), окружающая сердце и сосуды [5]. Предполагается, что основная функция МСК ЖТ заключается в регенерации поврежденных участков окружаемого органа, выработке биологически активных веществ, антиапоптотических, ростовых и иммуномодулирующих факторов. В то же время, являясь мультипотентными клетками, МСК ЖТ обладают свойством дифференцироваться в остеохондро- и адипогенные линии [6]. Количество информации о функции МСК ЖТ, окружающей сердце и сосуды, ограничено. Имеющиеся публикации

на эту тему свидетельствуют, что ЖТ, окружающая сердце и сосуды, является источником МСК, склонных к дифференцировке в различные типы клеток [7, 8]. Также известно, что паракринная активность МСК ЖТ, заключающаяся в продукции факторов роста и цитокинов, оказывает влияние на индуцирование ангиогенеза и повышение выживаемости кардиомиоцитов [5].

Способность МСК ЖТ дифференцироваться в остеобласты, секретирующие соли кальция во внеклеточное пространство, может являться звеном в патогенезе кальцификации сосудистой стенки. В настоящее время роль МСК ЖТ в формировании кальцификации сосуда мало изучена. Однако это направление представляется весьма перспективным с фундаментальной и клинической точки зрения, так как МСК могут быть не только одними из ключевых участников развития патологической кальцификации, но и выступать в качестве терапевтической мишени по средствам регуляции остеобластного потенциала. Имеющиеся публикации содержат противоречивые сведения о способности МСК ЖТ к остеогенезу. Так, А.Б. Малашичева и соавт. при сравнении МСК подкожно-жировой клетчатки здоровых доноров и пациентов с кальцификацией аортального клапана выявили низкий остеогенный потенциал последних [9]. В то же время имеются свидетельства о том, что способность МСК ЖТ к остеогенной дифференцировке зависит от локализации ткани [10].

Цель данного исследования – оценить остеогенный потенциал МСК эпикардальной жировой ткани по уровню экспрессии генов остеобластной дифференцировки и их белков у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 5 пациентов с ИБС в возрасте до 75 лет (подписавших добровольное информированное согласие на участие). Все пациенты

имели показания для проведения открытого вмешательства на сердце – прямой реваскуляризации миокарда методом коронарного шунтирования (КШ). В исследование не включали пациентов старше 75 лет с наличием клинически значимых сопутствующих патологий (сахарного диабета 1-го и 2-го типа, инфаркта миокарда (ИМ), анемии, почечной и печеночной недостаточности, онкологических и инфекционно-воспалительных заболеваний в период обострения, аутоиммунных заболеваний). Стволовые клетки эпикардиальной жировой ткани (ЭЖТ) выделяли из биоптатов ЖТ эпикардиальной локализации (массой 3–5 г).

Источник ЭЖТ – правые отделы сердца, зоны ее наибольшего присутствия (правое предсердие и правый желудочек). Полученные образцы ЭЖТ тщательно промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS) (Gibco, Китай) для очистки их поверхности от эритроцитов, тромбов и местных анестетиков. Затем ЭЖТ разрезали на маленькие кусочки неправильной формы (1–3 мм²) ножницами, средний вес кусочков ЭЖТ – около 4 г. И помещали в 20 мл PBS с добавлением пенициллина (600 ЕД/мл) (Gibco, США) и стрептомицина (300 мг/мл, Gibco, США) в пробирку объемом 50 мл на 5–10 мин при комнатной температуре для удаления остатков соединительной ткани и (или) дермы, кровеносных сосудов. Затем маленькие кусочки жировой ткани были пипетированы в культуральные флаконы (Biologix, Германия) объемом 25 см². Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 95% воздуха, 37 °C), в среде, поддерживающей рост МСК (MesenCult Proliferation Kit, STEMCELL Technologies, Канада) с добавлением 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина (Gibco, США). Когда первичные клетки достигали 80–90% конfluence, их обрабатывали 0,25%-м раствором трипсина (Трипсин, ПанЭко, Россия) и переносили в культуральные флаконы объемом 75 см² (Biologix, Германия), далее культивировали до 80–90% слияния клеток.

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТОК (ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ)

Для подтверждения того, что полученная культура клеток является мезенхимальными столовыми клетками, был определен их фенотип. В работе использовали комбинацию конъюгированных моноклональных антител: CD90 FITC (BC, IM1839U), CD 34 APC (BC, PNIM2472U), CD73 APCcy7 (Biolegend, 344022), CD 105 PE (Biolegend, 323206). Фенотип CD34-, CD73+, CD 90+, CD 105+ расценивался как соответствующий МСК ЖТ, согласно определению Международного общества по клеточной терапии

(ISCT). Результаты представлены в виде процентного выражения количества клеток, имеющих соответствующий антиген.

Стратегия гейтирования включала в себя удаление дуплетов на гистограмме FSC-H/FSC-A с дальнейшим выделением исследуемой популяции по FSC/SSC. По уровню экспрессии рецепторов CD90 и CD73 выделяли основную популяцию клеток: CD90+CD73+ (79,47%). Далее эта популяция была исследована на присутствие мембранных антигенов CD105 и CD34. CD 105 и CD 90 присутствовал на 79,71 %, при этом один антигенный маркер CD105 был на 17,54 % клеток, в то время как CD34 был только на 3,76% клеток. Таким образом, фенотип культуры клеток, полученной из ЭЖТ, был CD73+CD 90+CD105+CD34-/+.

ОСТЕОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МСК ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Для проведения остеогенной дифференцировки брали клетки 3-го пассажа из ЭЖТ на два флакона Т-75. На подготовительном этапе разводили фибронектин человека (ПанЭко, Россия) до концентрации 20 мкг/мл в однократном PBS и вносили его в 6-луночный планшет (для выделения РНК) и 8-луночную камеру Ibidi (Германия), чтобы белок покрыл культуральный пластик. Далее убирали фибронектин и промывали лунки PBS (Gibco, Китай), добавляли клетки в соответствующем объеме. Для запуска остеогенной дифференцировки клеток использовали набор MesenCult™ Osteogenic Differentiation Kit (Human, STEMCELL Technologies, Канада). Дифференцировка клеток проходила в течение 15 сут. Смену остеогенной среды проводили каждые 2–3 сут. В качестве контроля в экспериментах использовали клетки, в которых не была запущена остеогенная дифференцировка.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТЕОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА МСК ЖТ ПО УРОВНЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТОДОМ ПЦР

Экстракцию тотальной рибонуклеиновой кислоты (РНК) из МСК (скрининговая панель генов остеогенной дифференцировки (количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР)) после обратной транскрипции *RUNX2* (кодирует одноименный транскрипционный фактор), *SP7* (кодирует транскрипционный фактор Osterix), *BGLAP* (кодирует остеокальцин), *SPPI* (кодирует остеоопонтин) проводили на 15-е сут остеогенной. Для этого из 6-луночного планшета забирали среду, промывали каждую лунку планшета 1 мл однократного PBS, добавляли

в каждую лунку 1 мл тризола на 5 мин и соскребали лизат МСК скребком. Итого три лунки для остеогенно дифференцированных МСК и две лунки для недифференцированных МСК.

Для выделения РНК образцы помещали в охлажденный тризол («Реагент Extract RNA», Евроген, Россия) на 5 мин. Далее проводили выделение РНК методом гуанидин-тиоцианат-хлороформной экстракции с использованием тризола («Реагент Extract RNA», Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Количество и чистота выделенной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США), а ее качество – на флуориметре Qubit 4 (Invitrogen, США) путем оценки индекса RIQ (RNA Integrity and Quality) с использованием набора реагентов Qubit RNA Integrity Assay Kit (Invitrogen, США). Набор ОТ M-MuLV-RH (Biolabmix, Россия) использовали для проведения обратной транскрипции и синтеза комплементарной ДНК (кДНК) на ос-

нове выделенной РНК. Количество синтезированной кДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (ThermoScientific, США). Все образцы разводились в воде, свободной от РНКаз и ДНКаз («Стерильная вода, обработанная диэтилпиокарбонатом (DEPC, ДЭПК), без РНКаз и ДНКаз», Биолабмикс, Россия), до объема 1,5 мл с содержанием кДНК 20 нг/мл.

Результаты анализа представлены в виде относительной величины экспрессии, для расчета которой использовали метод ΔC_t (вариант метода Ливака – Шмиттгена), основанный на определении разницы между значениями C_t референсных генов и целевых значений C_t для каждого образца. Нормирование результатов ПЦР проводилось относительно среднего геометрического значения C_t трех референсных генов: *ACTB* (β -актин), *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), *B2M* (бета-2-микроглобулин) (таблица).

Таблица

Праймеры, используемые для оценки экспрессии генов остеогенной дифференцировки		
Название гена	Праймер	
	Прямой (Forward)	Обратный (Reverse)
Гены, использованные для нормализации при расчетах уровня экспрессии		
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAAATCC
<i>B2M</i>	TCCATCCGACATTGAAGTTG	CGGCAGGCATACTCATCTT
<i>ACTB</i>	CATCGAGCACGGCATCGTCA	TAGCACAGCCTGGACAGCAAC
Гены интереса		
<i>RUNX2</i>	AGATGGACCTCGGGAACCCA	TGAGGCGGGACACCTACTCT
<i>SP7</i>	TGCTTGAGGAGGAAGTTCAC	AGGTCACTGCCCACAGAGTA
<i>BGLAP</i>	TCACACTCCTCGCCCTATTG	TAGCGCCTGGGTCTCTTCAC
<i>SPP1</i>	CATCACCTGTGCCATACCAGTT	TTGGAAGGGTCTGTGGGGCTA

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ОКРАШИВАНИЕ МСК ЖТ И ОСТЕОБЛАСТОВ

Для проведения иммунофлуоресцентного окрашивания в качестве первичных антител были выбраны кроличьи и мышьиные антитела: RUNX2, остеоопонтин, остеокальцин, Osterix (Abcam, Великобритания). Окрашивали клетки синим флуоресцентным красителем для нуклеиновых кислот (DAPI) (разведение 1 : 100), детекцию результатов исследования проводили на конфокальном микроскопе. Анализ интенсивности флуоресценции проводили с помощью программы ImageJ. Анализировали по 10 полей зрения с каждого образца. Результаты анализа представлены в виде условных единиц интенсивности флуоресценции.

Статистическая обработка данных и графическое представление результатов проводились с ис-

пользованием стандартного пакета статистических методов программы IBM SPSS Statistics 27. Данные представлены в виде медианы (*Me*), 25%-го и 75%-го процентилей [25%; 75%]. Для оценки различий количественных признаков при сравнении двух независимых групп с отличным от нормального распределения был использован непараметрический *U*-тест Манна – Уитни. Критический уровень значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка иммунофенотипа клеточной культуры ЭЖТ

Получено, что в ЭЖТ пациента с ИБС на 79,71% клеток присутствовали CD105 и CD90, при этом один поверхностный маркер CD105 был на 17,54% клеток (рис. 1). Антигенные маркеры CD73 и CD90 присутствовали на 79,47% клеток, CD73 – на поверхности

18,26%, в то время как CD34 был только на 3,76% клеток. Таким образом, фенотип основной культуры клеток, полученной из ЭЖТ, был CD34-/-, CD73+, CD90+, CD105+, что соответствует одному из критериев МСК ЖТ [11]. Кроме основной популяции

клеток в культуре ЭЖТ присутствовали две минорные популяции: 1. CD90+,CD34+,CD73+,CD105 – предположительно эндотелиальная популяция, 2. CD 90+CD105-CD34-CD73 – самая немногочисленная популяция клеток.

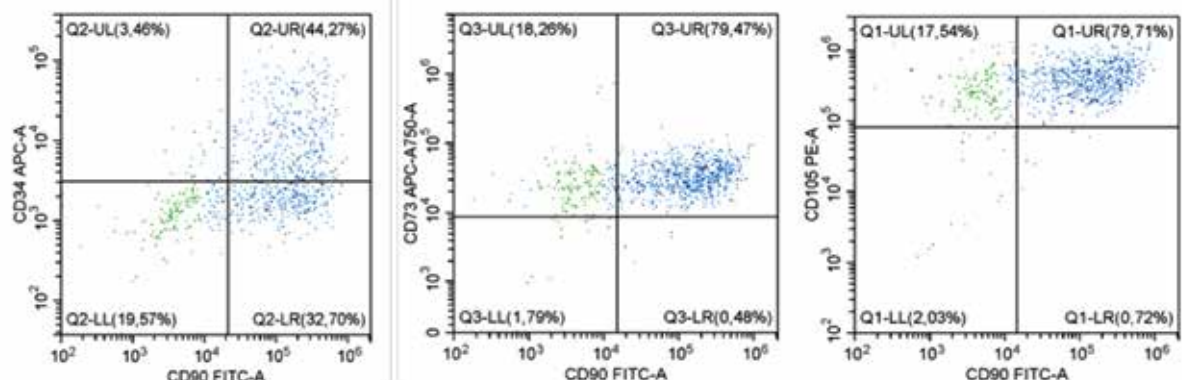


Рис. 1. Проточная цитометрия клеток, полученных из эпикардиальной жировой ткани пациента с ишемической болезнью сердца: синим цветом на рисунке обозначается самая большая популяция клеток по иммунофенотипу принадлежит к МСК, зеленый и розовый цвет – минорные популяции клеток

Экспрессия генов остеобластной дифференцировки

Изучение активации транскрипции генов, участвующих в остеогенной индукции, проводили на 15-е сут культивирования, так как в этот срок МСК приобретают специфические свойства преостеобластов и активно синтезируют белки костного матрикса. При проведении ПЦР в реальном времени было установлено, что экспрессия ключевого остеогенного фактора – гена *RUNX2* в клетках, культивированных в среде с остеоиндукторами была в 1,88 раза выше, чем в недифференцированных МСК (рис. 2).

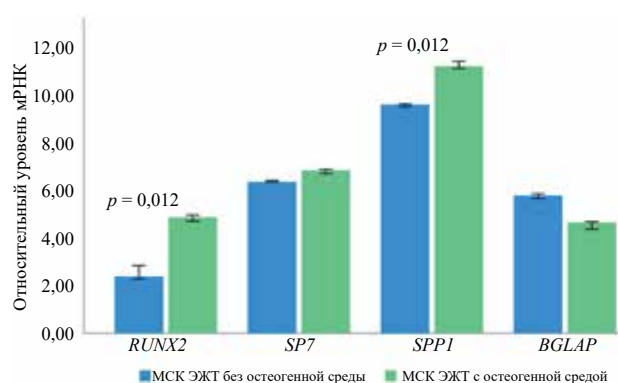


Рис. 2. Уровни экспрессии остеогенных генов в дифференцированных и недифференцированных мезенхимальных стволовых клетках эпикардиальной жировой ткани пациентов с ишемической болезнью сердца на 15-е сут культивирования

Аналогичные результаты были получены в отношении уровня экспрессии мРНК *SPPI* (OPN, остеопонтин), который так же, как и *RUNX2*, экспрессируется на ранних этапах дифференцировки мезенхимальных клеток в остеобласты. Так, экспрессия гена *SPPI* была в 1,35 раза выше в МСК, культивированных в присутствии остеогенной среды, чем в контроле.

Экспрессия *BGLAP*, кодирующего остеокальцин (OCN), ответственного за образование зрелого остеобласта, не отличалась в дифференцированных и недифференцированных культурах МСК. Экспрессия гена *SP7* (Osterix), ответственного за дифференцировку клеток в зрелые остеобласты и, наконец, в остециты во время формирования кости, также не отличалась как в клетках с остеобластной средой и без нее.

Иммунофлуоресцентная окраска

На основе результатов окраски специфическими антителами был проведен анализ влияния направленной остеогенной дифференцировки на культуру МСК ЭЖТ. Показано, что в культуре МСК ЭЖТ, полученной на 15-е сут после инкубации с остеобластной средой, по сравнению с контрольными МСК наблюдалось значимое ($p < 0,05$) увеличение половины изученных маркеров (рис. 3, 4). Так, ключевой регулятор и маркер остеогенной дифференцировки *RUNX2* был в 1,6 раза выше в индуцированных остеогенной средой МСК, чем в интактных (контрольных) культурах клеток. Другой маркер ранней остео-

генной дифференцировки OPN также был повышен на 1,6 раза в дифференцированных МСК. Стоит отметить, что методом иммунофлуоресцентной окра-

ски нами не выявлено различий в экспрессии Osterix и OCN между культурами дифференцированных и недифференцированных клеток (см. рис. 3, 4).

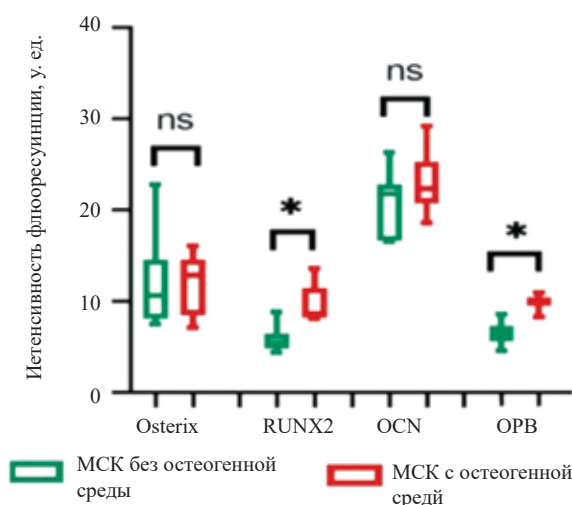


Рис. 3. Количественный анализ маркеров остеогенной дифференцировки МСК ЭЖТ в 3-м пассаже (на 15-е сут) методом иммунофлуоресцентной окраски

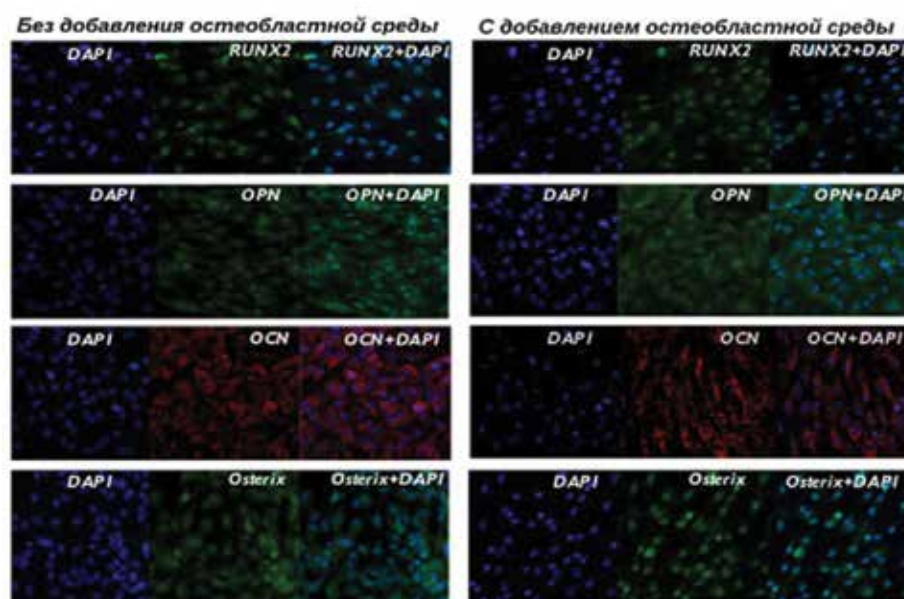


Рис. 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание изучаемых маркеров остеобластной дифференцировки: DAPI – ядерный краситель (4,6-диамино-2-фенилиндол), OCN – остеокальцин, OPN – остеопоинтин

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение остеокардиоваскулярного континуума является относительно новым и перспективным направлением современных научных исследований. В настоящее время показано, что при сосудистой кальцификации в клетках активируются различные сигнальные пути, характерные для формирования и репарации костей. Не так давно G. Fadini и соавт. показали, что клетки, полученные из костного мозга, могут иммигрировать из кровообращения в сосуды, трансформироваться в остеогенные клетки, а затем способствовать развитию сосудистой кальцификации [12]. Обладая потенциалом остеогенной

дифференцировки и рекрутирования поврежденных сосудов, МСК играют решающую роль в «теории циркулирующих кальцифицирующих клеток»; другими словами, они могут действовать как источник остеобластоподобных клеток. На данный момент роль МСК в процессе сосудистой кальцификации все еще остается неясной и противоречивой. Вопрос о том, способствуют ли МСК развитию сосудистой кальцификации или ингибируют его, еще предстоит определить.

В нашем исследовании мы изучали активацию генов транскрипции, участвующих в остеогенной индукции на 15-е сут культивирования МСК ЭЖТ, так как известно, что в этот срок мультипотентные

клетки приобретают специфические свойства преостеобластов и активно начинают синтезировать белки костного матрикса [13, 14].

Известно, что созревание и функция остеобластов напрямую связаны с экспрессией двух основных факторов транскрипции остеогенеза: *RUNX2* и транскрипционного фактора *SP7* (Osterix). Фактор транскрипции *RUNX2* является важным регулятором образования костей и остеогенной дифференцировки МСК; инициирует дифференцировку МСК в преостеобласты и подавляет адипо- и хондрогенную дифференцировку [15]. Во время дифференцировки остеобластов экспрессия *RUNX2* повышается в преостеобластах, достигает максимального уровня в прогениторных клетках и снижается в зрелых остеобластах [16]. *RUNX2* активирует экспрессию связанных с кальцификацией белков, таких как остеоопонтин, костный сиалопротеин II и остеокальцин, таким образом индуцируется синтез внеклеточного костного матрикса и минерализация.

По данным литературы, *RUNX2* незначительно экспрессируется в недифференцированных МСК и повышается во время пролиферации преостеобластов, что соответствует 7-м сут культивирования в остеогенной среде, далее его уровень поддерживается на относительно низком уровне на протяжении всего периода дифференцировки остеобласта. Анализ RT-PCR показал, что экспрессия гена *RUNX2* повышается после 7-х сут культивирования и достигает пиковых значений на 21-е сут [17]. В нашей работе показано, что уровень мРНК *RUNX2* в клетках, культивированных в остеогенной среде, был на 66% выше, чем в недифференцированных МСК. По результатам иммунофлуоресцентного исследования также отмечено, что белок *RUNX2* был выше в дифференцированной культуре клеток.

Вторым по значимости фактором после *RUNX2*, индуцирующим дифференцировку остеобластов и синтез костно-специфических белков, является Osterix [18]. Оба этих фактора регулируют каскад активации генов, кодирующих костно-специфические белки, формирующие костную ткань. [19]. Экспрессия *SP7* необходима для осуществления дифференцировки преостеобластов в зрелые и функциональные остеобласты. Но одно из самых важных функций данного белка то, что он ингибирует дифференцировку хондроцитов в *RUNX2*-экспрессирующих остеобластах-предшественниках [20]. В нашей работе уровень экспрессии гена *SP7* не отличался у дифференцированных и недифференцированных МСК. Также при выполнении иммунофлуоресцентного окрашивания данного маркера остеогенеза не получено достоверной разницы между Osterix в культу-

рах дифференцированных и недифференцированных клеток. При этом уровень экспрессии мРНК *SP7* и белка Osterix был на достаточно высоком уровне в МСК, инкубированных как с остеобластной средой, так и без нее. Возможно, отсутствие достоверной разницы между дифференцированными и недифференцированными МСК может быть вследствие того, что по литературным данным увеличение экспрессии гена *SP7* отмечается в более поздние сроки, примерно на 16–21-е сут формирования остеобласта (фаза синтеза внеклеточного матрикса) [21].

Остеопонтин, один из основных неколлагеновых белков, играет важную роль в ремоделировании кости. OPN не только опосредует раннюю дифференцировку остеобластов, но и активирует функцию резорбции остеокластов. Высокий уровень экспрессии гена *SPPI*, кодирующего синтез OPN, свидетельствует об активном процессе формирования костного внеклеточного матрикса, так как OPN является основным неколлагеновым белком кости. Максимальная активность OPN соответствует стадии минерализации в процессе остеогенеза [22]. Результаты нашего исследования согласуются с имеющимися данными о том, что пик экспрессии *SPPI* во время дифференцировки остеобластов достигается дважды: во время пролиферации и минерализации, что соответствует 3-м и 14-м сут дифференцировки. С помощью конфокальной микроскопии на 15-е сут остеобластной дифференцировки мы также обнаружили, что уровень OPN был выше в дифференцированных клетках. Кроме того, генная экспрессия *SPPI* и уровень OPN, полученный по результатам иммунофлуоресцентного исследования, были выше других изучаемых остеогенных маркеров. Эти данные могут свидетельствовать о том, что процесс остеогенеза в культурах клеток находится в начальной стадии синтеза внеклеточного матрикса.

Следующим этапом была оценена экспрессия гена *BGLAP*, кодирующего OCN. Его уровень был ниже других изученных маркеров, что согласуется с данными литературы. OCN выполняет механическую функцию в костном матриксе благодаря своей способности прочно связывать гидроксипатит и образовывать комплекс с коллагеном через матриксный белок остеоопонтин [23]. OCN используется в качестве позднего маркера костеобразования, так как экспрессируется на поздних этапах минерализации внеклеточного матрикса зрелыми остеобластами, что соответствует 16–21-м сут дифференцировки. Вероятно, это объясняет тот факт, что мы в своем исследовании не наблюдали увеличение уровня гена *BGLAP* и белка OCN в культурах дифференцированных МСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

МСК ЭЖТ имеет остеогенный потенциал, что проявляется экспрессией генов остеогенной дифференцировки как в культурах дифференцированных, так и недифференцированных МСК. Эти данные могут быть основой для дальнейшего изучения МСК ЭЖТ с позиции их роли в формировании сосудистой кальцификации у пациентов с ИБС. Высокий уровень экспрессии *SPPI* и относительно низкие уровни *RUNX2* и *BGLAP* в дифференцированных культурах могут свидетельствовать о том, что на 15-е сут инкубации МСК ЭЖТ являются преостеобластами и находятся на начальной стадии синтеза внеклеточного матрикса.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Майоров Г.Б., Курбанов С.К., Власова Э.Е., Галютдинов Д.М., Васильев В.П., Ширяев А.А. и др. Проблема кальциноза при коронарной болезни сердца: вопросы диагностики, прогноза и выбора лечения. *Кардиологический вестник*. 2018;13(4):4–10. DOI: 10.17116/Cardiobulletin2018130414.
2. Костина Д.А., Успенский В.Е., Семенова Д.С. Молекулярные механизмы сосудистой кальцификации. *Трансляционная медицина*. 2020;7(1):6–21. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-1-6-21.
3. Xie C., Ouyang L., Chen J., Zhang H., Luo P., Wang J. et al. The emerging role of mesenchymal stem cells in vascular calcification. *Stem Cells International*. 2019;2875189. DOI: 10.1155/2019/2875189.
4. Leszczynska A., Murphy J.M. Vascular calcification: Is it rather a stem/progenitor cells driven phenomenon? *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018;6:10. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00010.
5. Krawczenko A., Klimczak A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells and their contribution to angiogenic processes in tissue regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(5):2425. DOI: 10.3390/ijms23052425.
6. Нимирицкий П., Сагарадзе Г.Д., Ефименко А.Ю. Ниша стволовой клетки. *Цитология*. 2018;60(8):575–586. DOI: 10.31116/tsitol.2018.08.01.
7. Ozkaynak B., Şahin I., Ozenc E., Subasi C., Oran D.S., Totoz T. et al. Mesenchymal stem cells derived from epicardial adipose tissue reverse cardiac remodeling in a rabbit model of myocardial infarction. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2021;25(12):4372–4384. DOI: 10.26355/eur-rev_202106_26147.
8. Lambert C., Arderiu G., Bejar M.T. et al. Stem cells from human cardiac adipose tissue depots show different gene expression and functional capacities. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1):361. DOI: 10.1186/s13287-019-1460-1.
9. Malashicheva A., Irtyuga O., Kostina A., Ignatieva E., Zhiduleva E., Semenova D. et al. Osteogenic potential of adipose mesenchymal stem cells is not correlated with aortic valve calcification. *Biological Communications*. 2018;63(2):117–122.
10. Kostina A., Lobov A., Semenova D., Kiselev A., Klausen P., Malashicheva A. Context-specific osteogenic potential of mesenchymal stem cells. *Biomedicines*. 2021;9(6):673. DOI: 10.3390/biomedicines9060673.
11. Bourin P., Bunnell B. A., Casteilla L., Dominici M. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the international So. *Cytotherapy*. 2013;15(6):641–648. DOI: 0.1016/j.jcyt.2013.02.006.
12. Fadini G.P., Rattazzi M., Matsumoto T., Asahara T., Khosla S. Emerging role of circulating calcifying cells in the bone-vascular axis. *Circulation*. 2012;125(22):2772–2781. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.090860.
13. Соловьев В.А., Шинкаренко Т.В. Происхождение, дифференцировка и морфофункциональная характеристика клеток костной ткани. *Верхневолжский медицинский журнал*. 2011;9(3):49–54.
14. Zhou P., Shi J.M., Song J.E., Han Y., Li H.J., Song Y.M. et al. Establishing a deeper understanding of the osteogenic differentiation of monolayer cultured human pluripotent stem cells using novel and detailed analyses. *Stem Cell Res. Ther.* 2021;12(1):41. DOI: 10.1186/s13287-020-02085-9.
15. Xu J., Li Z., Hou Y., Fang W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *American Journal of Translational Research*. 2015;7(12):252–235.
16. Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by runx2. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(7):1694. DOI: 10.3390/ijms20071694.
17. Zhou P., Shi J.M., Song J.E. Establishing a deeper understanding of the osteogenic differentiation of monolayer cultured human pluripotent stem cells using novel and detailed analyses. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021;21(12):41. DOI: 10.1186/s13287-020-02085-9.
18. Rashid H., Ma C., Chen H., Wang H., Hassan M.Q. et al. Sp7 and Runx2 molecular complex synergistically regulate expression of target genes. *Connect Tissue Research*. 2014;55(1):83–87. DOI: 10.3109/03008207.2014.923872.
19. Kawane T., Komori H., Liu W., Moriishi T., Miyazaki T., Mori M. et al. Dlx5 and mef2 regulate a novel runx2 enhancer for osteoblast-specific expression. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2014;29(9):1960–1969. DOI: 10.1002/jbmr.2240.
20. Sinha K.M., Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013;114(5):975–984. DOI: 10.1002/jcb.24439.
21. Pokrovskaya L.A., Nadezhdin S.V., Zubareva E.V., Burda Y.E., Gnezdyukova E.S. Expression of RUNX2 and osterix in rat mesenchymal stem cells during culturing in osteogenic-conditioned medium. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020;169(4):571–575. DOI: 10.1007/s10517-020-04931-5.
22. Si J., Wang C., Zhang D., Wang B., Zhou Y. Osteopontin in bone metabolism and bone diseases. *Medical Science Monitor*. 2020;26:e919159. DOI: 10.12659/MSM.919159.
23. Zoch M.L., Clemens T.L., Riddle R.C. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*. 2016;82:42–49. DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.046.

Вклад авторов

Учасова Е.Г., Груздева О.В., Дылева Ю.А. – разработка концепции и дизайна исследования. Учасова Е.Г., Слесарева Т.А., Понасенко А.В., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Двадцатов И.В. – анализ и интерпретация данных. Учасова Е.Г. Дылева Ю.А., Белик Е.В., Груздева О.В. – обоснование рукописи или проверка критически важного интеллектуального содержания. Учасова Е.Г., Слесарева Т.А., Тарасова О.Л., Груздева О.В. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Информация об авторах

Учасова Евгения Геннадьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория исследований гомеостаза, НИИ КПССЗ, г. Кемерово, evg.uchasova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4321-8977>

Дылева Юлия Александровна – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория исследований гомеостаза, НИИ КПССЗ, г. Кемерово, dyleva87@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6890-3287>

Слесарева Тамара Александровна – врач клинической лабораторной диагностики, НИИ КПССЗ; аспирант, кафедра патологической физиологии, КемГМУ, г. Кемерово, soloveva081296@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0749-4093>

Белик Екатерина Владимировна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория исследований гомеостаза, НИИ КПССЗ, г. Кемерово, sionina.ev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3996-3325>

Понасенко Анастасия Валериевна – канд. мед. наук, зав. лабораторией геномной медицины, НИИ КПССЗ, г. Кемерово, PonaAV@kemcardio.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3002-2863>

Великанова Елена Анатольевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория клеточных технологий, НИИ КПССЗ, г. Кемерово, veliea@kemcardio.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1079-1956>

Матвеева Вера Геннадьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточных технологий, НИИ КПССЗ, г. Кемерово, matveeva_vg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4146-3373>

Двадцатов Иван Викторович – канд. мед. наук, врач сердечно-сосудистый хирург, НИИ КПССЗ, г. Кемерово, dvadiv@kemcardio.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2243-1621>

Тарасова Ольга Леонидовна – канд. мед. наук, доцент, за. кафедрой патологической физиологии, НИИ КПССЗ, г. Кемерово, pathophysiology_kaf@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7992-645X>

Груздева Ольга Викторовна – д-р мед. наук, профессор РАН, зав. лабораторией исследования гомеостаза, НИИ КПССЗ; зав. кафедрой медицинской биохимии, КемГМУ, г. Кемерово, o_gruzdeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7780-829X>

(✉) **Учасова Евгения Геннадьевна**, evg.uchasova@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.04.2024;
одобрена после рецензирования 26.06.2024;
принята к публикации 12.09.2024