

## ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА И ПОДКОЖНО-ЖИРОВОЙ КЛЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА, В КЛЕТКИ КОСТНОЙ ТКАНИ

© И. П. Савченкова,<sup>1</sup> М. С. Ростовская,<sup>2</sup> Н. И. Чуникова,<sup>2</sup>  
С. З. Шарифуллина,<sup>2</sup> А. С. Тепляшин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский государственный научно-исследовательский институт  
экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко РАСХН  
и <sup>2</sup> ООО «Институт стволовой клетки», Москва;

<sup>1</sup> электронный адрес: S-IP@mail.ru

Из двух разных источников — костного мозга (КМ) и подкожно-жировой клетчатки (ПЖК) человека — были выделены клеточные популяции с фенотипом, подобным мультипотентным мезенхимным стромальным клеткам. Сравнительный анализ эффективности дифференцировки в направлении остеогенеза обнаружил морфологические изменения, подтвержденные окраской ализариновым красным и von Kossa в клетках костного мозга на 14-е сут, а в клетках жировой ткани — на 28-е сут культивирования в среде с индукторами. Анализ экспрессии генов *остеопонтина (ОП)*, *остеокальцина* и *костного сиалопротеина* в реакции ОТ-ПЦР выявил различия в потенциях этих клеток к дифференцировке в клетки костной ткани. Клетки, выделенные из КМ, как в контрольной, так и в экспериментальной группах были позитивны по ОП на 14-е сут. В отличие от них в клетках, выделенных из ПЖК в среде без индуктора, продукта экспрессии гена ОП не выявлено. ОП появлялся в клетках, подвергнутых дифференцировке, на 14-е сут. В клетках КМ остеокальцин был обнаружен на 14-е, а костный сиалопротеин (КС) — на 21-е сут культивирования в индукционной среде. В клетках, выделенных из ПЖК, ОК и КС не были выявлены даже на 28-е сут после начала индукции.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, костный мозг, подкожно-жировая клетчатка, дифференцировка, остеогенез, *in vitro*, экспрессия генов.

Принятые сокращения: АГ — антиген, АТ — антитело, КМ — костный мозг, КС — костный сиалопротеин, ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ОК — остеокальцин, ОП — остеопонтин, ПЖК — подкожно-жировая клетчатка, СПК — сыворотка плода коров, ФЭ — фикоэритрин, PBS — фосфатно-солевой буфер.

Появились сообщения о выделении из жировой ткани человека клеток с фенотипом, подобным мезенхимным стромальным клеткам костного мозга, которые мультипотентны и при индукции к дифференцировке способны формировать клетки костной, хрящевой и жировой тканей (Zuk et al., 2001, 2002; Тепляшин и др., 2005б). Наличие альтернативного биологически доступного источника мультипотентных клеток актуально для тканевой инженерии. На сегодняшний день достаточно хорошо изучены факторы, вызывающие дифференцировку ММСК в клетки костной ткани. Интенсивно ведутся работы по моделированию остеогенеза как в монослое, так и в трехмерных структурах, т. е. на матрицах-носителях (Logeart-Avramoglou et al., 2005; Kneser et al., 2006). ММСК, подвергнутые дифференцировке *in vitro* в клетки костной ткани, представляют собой удобную модельную систему для изучения событий, происходящих в остеогенезе на молекулярном уровне. Однако данные, демонстрирующие равноценность популяций ММСК, выделенных из КМ и ПЖК, по способности дифференцироваться в направлении остеогенеза носят противоречивый характер.

Целью нашей работы было сравнить потенции ММСК, выделенных из двух разных источников, при индукции к дифференцировке в клетки костной ткани *in vitro* на уровне экспрессии генов-маркеров остеогенеза.

### Материал и методика

Костный мозг в количестве 10—15 мл получали у здоровых доноров (с их информированного согласия) методом пунктирования гребня подвздошной кости под внутривенной анестезией. Костный мозг разбавляли в 4 раза PBS с Li-гепарином (Sarstedt, Германия) и выделяли фракцию моноядерных клеток центрифугированием в течение 25 мин при 650 g в градиенте фикола (Ficoll-Paque, Pharmacia, Швеция) по методу, описанному нами ранее (Тепляшин и др., 2005а). ПЖК брали у тех же пациентов из области пупка (липоаспирация) под местной анестезией. Жировую ткань тщательно промывали PBS, измельчали и подвергали ферментативной обработке 0.075%-ным раствором коллагеназы типа I (Gibco, Invitro-

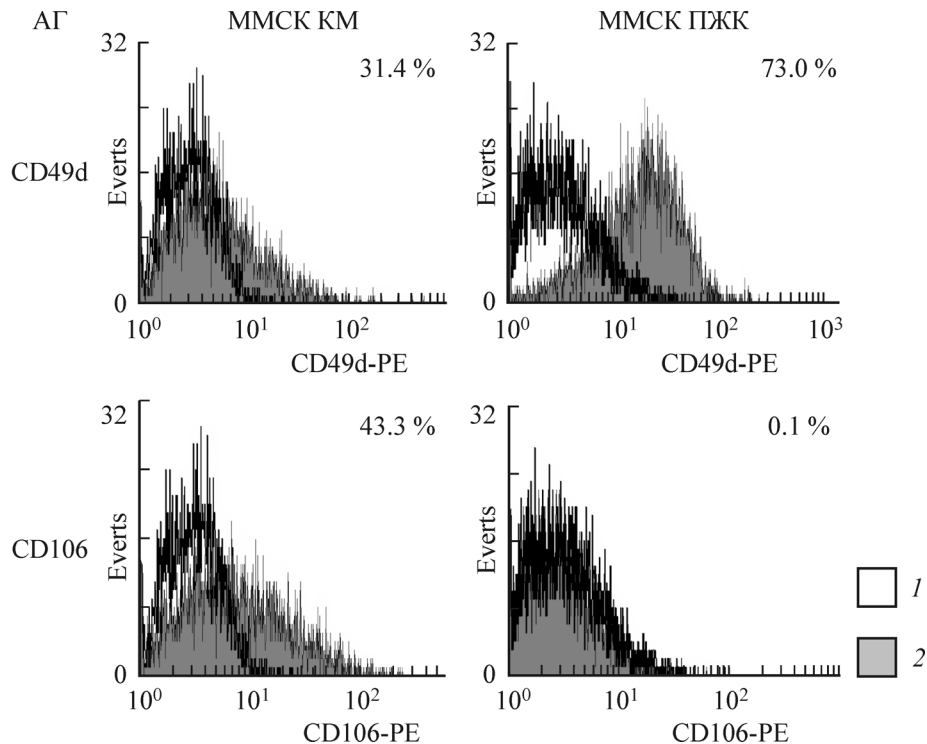


Рис. 1. Различия в экспрессии  $\alpha 4$ -интегрина (CD49d) и VCAM (CD106) на поверхности ММСК, выделенных из КМ и ПЖК. 1 (белый цвет) — гистограммы, соответствующие контрольному окрашиванию клеток IgG, меченных ФЭ; 2 (серый цвет) — гистограммы, соответствующие окрашиванию специфическими АТ.

gene, Life Technologies, США) на основе ДМЕМ (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, США) при 37 °С в течение 30 мин. Коллагеназу нейтрализовали эквивалентным объемом питательной среды ДМЕМ, дополненной 10 % СПК (HyClone, Perbio, Бельгия), и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в ДМЕМ и пропускали через фильтры с диаметром пор 100 мкм для удаления клеточных остатков. Клетки снова осаждали центрифугированием с ускорением 200 g в течение 5 мин и ресуспендировали в питательной среде. Средой для культивирования ММСК была ДМЕМ с низким содержанием глюкозы (1 г/л), дополненная 10 % СПК, однократным раствором заменимых аминокислот и антибиотиками (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, США). Конечная концентрация стрептомицина была 100 мкг/мл, а пенициллина — 100 Ед/мл. Морфологическую характеристику клеток проводили визуально: в нативных препаратах и в препаратах, окрашенных по Романовскому—Гимза.

Для выявления поверхностных АГ клетки анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Epics Elite Coulter. Для этого клетки снимали с субстрата 0.25%-ным раствором трипсина, подсчитывали, отмывали и аликвоты в концентрации  $2 \cdot 10^5$  инкубировали с первичными антителами в разведении 1 : 30 (PBS, дополненный 2 % СПК) при 4 °С в течение 45 мин в темноте. Первичные мышинные АТ, используемые в наших

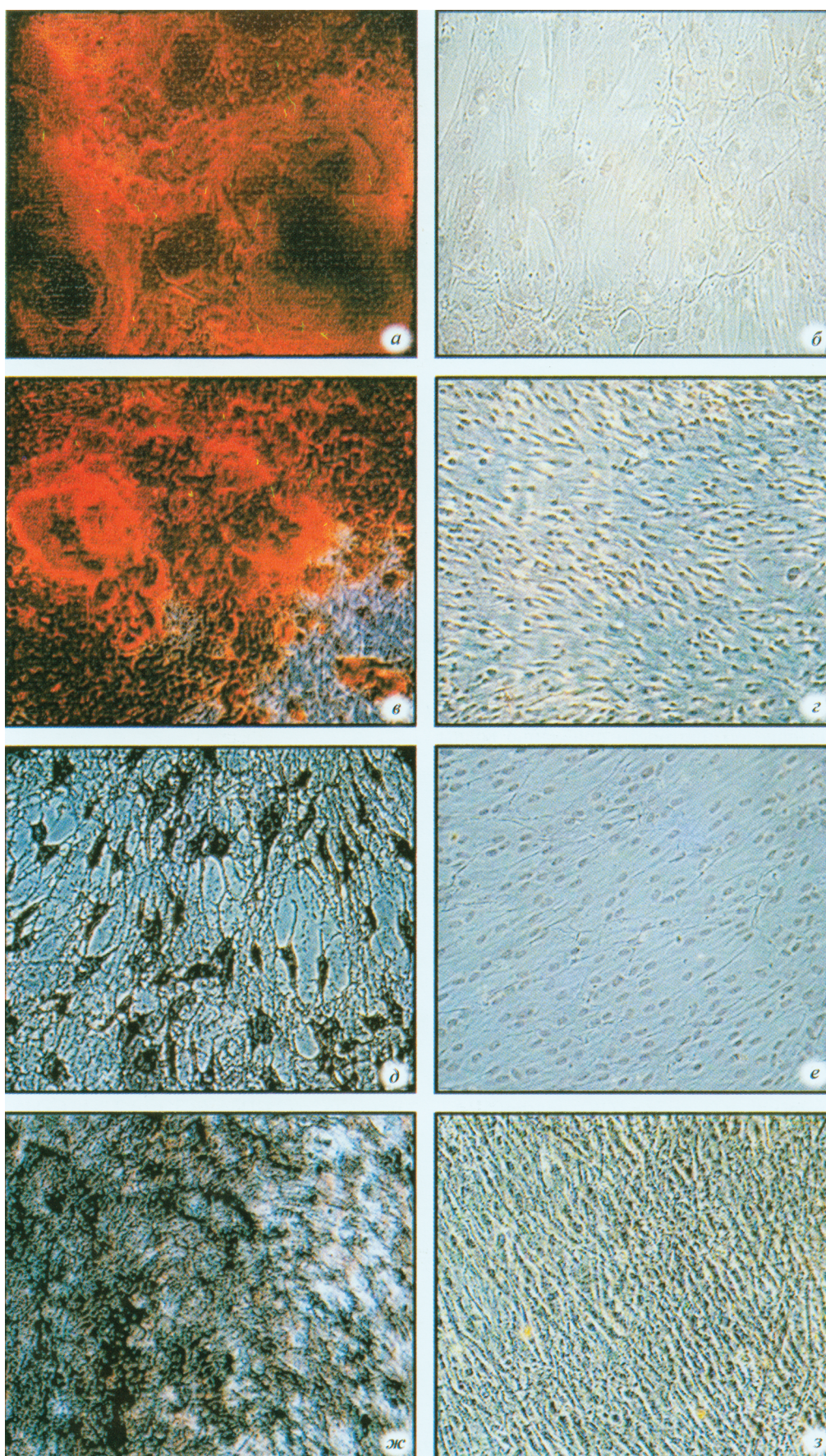
экспериментах, были против АГ человека: CD10, CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49 (a, b, d), CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD133, CD166, Stro-1 и HLA DR-II, HLA DP и HLA DQ (Becton Dickinson, США). В качестве вторичных АТ использовали антимышинные IgG, меченные ФЭ, в разведении 1 : 30, той же фирмы.

Средой для дифференцировки в клетки костной ткани была ДМЕМ, дополненная СПК (10 %), дексаметазоном ( $10^{-7}$  М),  $\beta$ -глицерофосфатом (10 мМ) и аскорбиновой кислотой (0.2 мМ) (Reyes et al., 2001). Дифференцировку ММСК в клетки костной ткани изучали в динамике. Через 14, 21 и 28 сут после начала индукции часть клеток окрашивали по von Kossa и ализариновым красным, а часть клеток параллельно использовали для выделения РНК. В качестве контроля были использованы клетки, культивируемые в среде без индукторов.

Выделение РНК из клеток проводили с использованием набора SV Total RNA Isolation System (Promega, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Клетки трипсинизировали и дважды промывали PBS. К клеточному осадку добавляли 175 мкл лизирующего раствора, затем 350 мкл буферного раствора для разведения (SV Dilution Buffer), аккуратно смешивали и инкубировали 3 мин при 70 °С. Смесь центрифугировали, супернатант переносили в чистую пробирку и добавляли 200 мкл 95%-ного этанола. Раствор переносили в колонку (Spin

Рис. 2. Дифференцировка ММСК КМ и ПЖК в клетки костной ткани.

Окраска ализариновым красным: а — ММСК КМ на 28-е сут культивирования в остеогенной среде; б — ММСК КМ на 28-е сут в среде без индуктора; в — ММСК ПЖК на 28-е сут культивирования в остеогенной среде; г — ММСК ПЖК на 28-е сут в среде без индуктора. Окраска по von Kossa: д — ММСК КМ на 28-е сут культивирования в остеогенной среде; е — ММСК КМ на 28-е сут в среде без индуктора; ж — ММСК ПЖК на 28-е сут культивирования в остеогенной среде; з — ММСК ПЖК на 28-е сут в среде без индуктора. Об. 20 $\times$ , ок. 10 $\times$ .



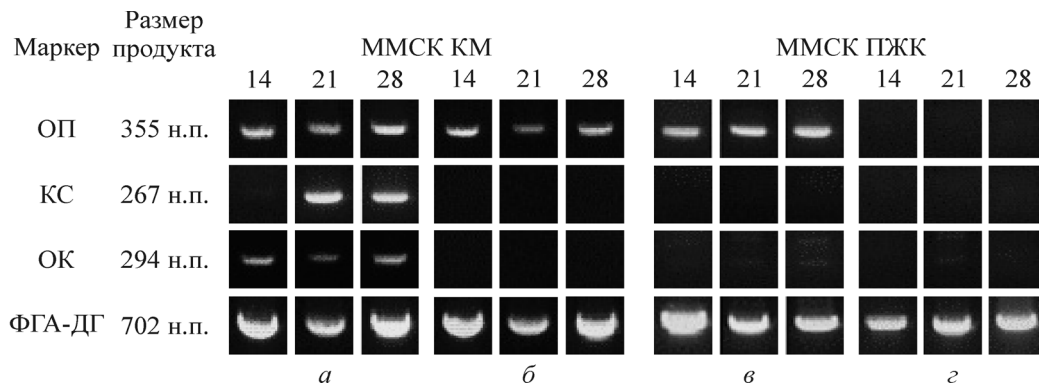


Рис. 3. Изменение экспрессии генов: *остеопонтина* (ОП), *остеокальцина* (ОК) и *костного сиалопротеина* (КС) в процессе дифференцировки ММСК КМ и ПЖК в клетки костной ткани.

а — ОП, ОК и КС в ММСК КМ, культивируемых в остеогенной среде; б — ОП, ОК и КС в ММСК КМ, культивируемых в среде без индукторов; в — экспрессия генов костной ткани в ММСК ПЖК, культивируемых в остеогенной среде; г — экспрессия генов костной ткани в ММСК ПЖК, культивируемых в рабочей среде без индукторов. Цифры сверху — время, сут.

Column Assembly) и центрифугировали со скоростью 16 000 g в течение 1 мин. Колонку промывали 600 мкл раствора для промывки (SV RNA Wash Solution) и наносили 50 мкл инкубационной смеси, содержащей ДНКазу I. После 15 мин инкубации при комнатной температуре добавляли 200 мкл Стоп-раствора (SV DNase Stop Solution), центрифугировали со скоростью 16 000 g в течение 1 мин и дважды промывали раствором (SV RNA Wash Solution), как было описано выше. РНК элюировали в 100 мкл воды, свободной от нуклеаз, и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Концентрацию выделенной РНК определяли путем измерения оптической плотности при длине волны 260 нм по формуле  $\text{IOD} = 40 \text{ мкг РНК/мл}$ .

Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 10 мкл. 1 мкг РНК в объеме 6.5 мкл вносили в тонкостенную пластиковую пробирку объемом 0.2 мл, добавляли 250 нг праймера олиго-(17)dT (Promega, США), денатурировали при  $90^{\circ}\text{C}$  в течение 2 мин, после чего быстро переносили в лед. К денатурированной РНК вносили 3 мкл реакционной смеси, содержащей следующие компоненты: буфер Mo-MuLV (100 mM Трис-НСl, pH 8.3, 30 mM  $\text{MgCl}_2$ , 750 mM КСl и 100 mM DTT), по 0.5 mM каждого из дНТФ, 5 ед. акт. ингибитора РНаз (Promega, США) и 15 ед. акт. Mo-MuLV обратной транскриптазы (Promega, США). Смесь инкубировали 45 мин при  $42^{\circ}\text{C}$ , затем 10 мин при  $94^{\circ}\text{C}$ .

Для ПЦР-реакции были использованы следующие праймеры на маркеры: *остеокальцин* (ОК), прямой 5'-ATGAGAGCCCTCACACTCCTC-3' и обратный 5'-GCCGTA GAAGCGCCGATAGGC-3' (Caterson et al., 2002); *остеопонтин* (ОП), прямой 5'-ACCSTTCCAAGTAAGTCCA-AC-3' и обратный 5'-AGGTGATGTCCTCGTCTGTGA-3'; *костный сиалопротеин* (КС) II типа, прямой 5'-AAGG-GCACCTCGAAGACAAC-3' и обратный 5'-ACCATCATAGCCATCGTAGC-3'; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ФГА-ДГ), прямой 5'-GGGCTCSTTTTAACTCTGTG-3' и обратный 5'-TGGCAGGTTTTTCTAGACGG-3' (Caterson et al., 2002). Праймеры на ОП и КС были подобраны к опубликованным последовательностям мРНК BC093033 и NM\_004967 (GenBank) соответственно. В качестве контроля на реакцию использовали мРНК гена ФГА-ДГ.

Инкубацию реакционной смеси проводили при следующих условиях: предварительная денатурация при  $94^{\circ}\text{C}$  — 3 мин; далее 35 циклов по схеме: 1) денатурация

при  $94^{\circ}\text{C}$  — 20 с; 2) отжиг праймеров при  $55^{\circ}\text{C}$  — 20 с; 3) элонгация при  $72^{\circ}\text{C}$  — 40 с. После окончания циклов проводили заключительную элонгацию при  $72^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин.

Электрофорез препаратов ДНК проводили в 2%-ном агарозном геле в Трис-ацетатном буфере (ТАЕ). Для визуализации ДНК гель окрашивали в течение 10—20 мин в растворе бромистого этидия (5 мкг/мл в ТАЕ). Визуализацию результатов проводили в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм. Размер фрагментов ДНК определяли с помощью ДНК-маркера (Promega, США).

## Результаты

Из КМ и ПЖК были получены клетки, которые имели фибробластоподобную морфологию и высокие адгезивные и клонообразующие способности. Цитофлуориметрический анализ выявил на их поверхности наличие АГ, экспрессия которых характерна для ММСК человека. Так, клетки, выделенные из КМ и ПЖК, положительно окрашивались АТ к АГ: CD10 (78.5 и 79.4 %), CD13 (99.0 и 99.5 %), CD29 (98.7 и 98.8 %), CD44 (98.1 и 98.6 %), CD49a (89.9 и 69.2 %), CD49b (90.1 и 96.8 %), CD71 (88.1 и 85.1 %), CD73 (99.6 и 99.2 %), CD90 (99.2 и 99.2 %), CD105 (99.5 и 97.4 %), CD166 (99 и 97.9 %), HLA ABC (99.4 и 99 %) соответственно. Все типы клеток были отрицательны по CD34 (0.3 и 3.2 %), CD45 (0.1 и 1.2 %) и CD133 (0.9 и 1.6 %) — маркерам гематopoэтических клеток, CD31 (0.5 и 2.3 %) — маркеру эндотелиальных клеток, а также HLA DP (2.3 и 1.85 %) и HLA DQ (0.3 и 1 %) соответственно. Доля клеток, положительно окрашенных АТ к рецептору фактора стволовых клеток c-kit (CD117), составляла 7 % для клеточной популяции, выделенной из КМ, а для ПЖК — 1.2 %. Полученные нами две популяции клеток были отрицательны по Stro-1 (0.3 и 0.5 %). Данные приведены по 5 донорам. Сравнительный анализ клеток, выделенных из КМ и ПЖК, выявил значительные различия в количестве клеток, положительно окрашенных по  $\alpha 4$ -интегрину (CD49d) и молекуле клеточной адгезии VCAM (CD106) (рис. 1).

При культивировании в среде, индуцирующей дифференцировку в клетки костной ткани, морфологические изменения в клетках, выделенных из КМ, наблюдали на 14-е сут, в то время как в клетках, выделенных из ПЖК,

эти изменения были обнаружены только на 28-е сут культивирования. В клетках, выделенных из КМ, подвергнутых дифференцировке, наблюдали формирование высокоспециализированных клеток костной ткани — остеоцитов. Визуальная оценка подтверждалась окраской экспериментальных образцов ализариновым красным и по von Kossa (рис. 2).

В качестве маркеров, специфичных для костной ткани, нами были выбраны ОП, ОК и КС. На рис. 3 представлены результаты ОТ-ПЦР. Анализ экспрессии генов в процессе дифференцировки ММСК КМ и ПЖК в клетки костной ткани обнаружил, что клетки, выделенные из КМ, как в контрольной, так и в экспериментальной группах были позитивны по ОП на 14-е сут. В отличие от них в клетках, выделенных из ПЖК в среде без индуктора, продукт экспрессии гена ОП не был выявлен. ОП появлялся в клетках, подвергнутых дифференцировке, на 14-е сут. В наших экспериментах продукт экспрессии гена ОК был обнаружен только в клетках КМ, подвергнутых дифференцировке, на 14-е сут. В клетках КМ, подвергнутых дифференцировке, была обнаружена экспрессия КС на 21-е и 28-е сут культивирования в индукционной среде. В клетках, выделенных из ПЖК, ОК и КС не были выявлены даже на 28-е сут индукции.

### Обсуждение

Ранее нами были выделены и охарактеризованы клетки с фенотипом, подобным ММСК из КМ и ПЖК взрослого организма человека (Тепляшин и др., 2005а). Следует заметить, что на сегодняшний день отсутствуют данные об уникальном маркере для идентификации ММСК КМ. Тем не менее считается, что ММСК положительно окрашиваются такими АГ, как SH2, SH3 и SH4 (Haynesworth et al., 1992). АГ, связывающий АТ SH2, был идентифицирован как эндоглин (CD105), рецептор для трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$ 1 (Barry et al., 1999). АТ SH3 и SH4 распознают отдельные эпитопы белка 5'-нуклеотидазы (CD73), который связан с мембраной и играет существенную роль в активации В-лимфоцитов. Поверхностный АГ SB10 также часто используется для идентификации ММСК человека (Bruder et al., 1998). Экспрессия этого АГ активируется молекулами клеточной адгезии лейкоцитов (ALCAM и CD166). В наших экспериментах клетки, полученные как из КМ, так и из ПЖК, высоко экспрессировали данные АГ. Сравнительный анализ клеток, выделенных из КМ и ПЖК, выявил значительные различия в количестве клеток, положительно окрашенных по  $\alpha$ 4-интегрину (CD49d) и молекуле клеточной адгезии VCAM (CD106). Подобные различия, наблюдаемые в наших экспериментах, были выявлены и другими исследователями. Продемонстрировано сходство популяций стволовых клеток, выделенной из жировой ткани, с ММСК костного мозга по таким маркерам, как CD29, CD44, CD71, CD90 и CD105 (De Ugarte et al., 2003). Однако клетки имели значительные различия по экспрессии двух АГ — CD49d и CD106. Интересным оказался факт, что полученные нами две популяции клеток были отрицательны по Stro-1. Экспрессия этого АГ, как известно, характерна для стромальных клеток КМ с остеогенным потенциалом (Simmons, Tokok-Strob, 1991). Можно предположить, что в полученных нами популяциях изначально не присутствовали клетки с остеогенным потенциалом.

Формирование кости включает в себя цепь последовательных событий, которые можно условно разделить на три фазы: пролиферативную с секрецией матрикса, созревание матрикса и минерализация матрикса (Owen et al., 1990). Для каждой из перечисленных фаз характерна экспрессия различных генов. Считается, что ОП принадлежит к одному из ранних маркеров, свидетельствующих об инициации дифференцировки ММСК в остеогенном направлении. Его экспрессия характерна для предшественников остеобластов (преостеобластов) и связана с пролиферативной стадией образования кости и началом минерализации матрикса (Mark et al., 1987). С другой стороны, есть мнение о том, что ОП не является специфичным маркером (Yao et al., 1994). В наших экспериментах ОП обнаружен в ММСК КМ, культивируемых как в индукционной среде, так и без индукции, в то время как в ММСК ПЖК он присутствовал только в клетках, культивируемых в остеогенной среде.

К специфичным маркерам, характеризующим более позднюю стадию дифференцировки, включая окраску по von Kossa (Puchtler, Meloan, 1978), относят ОК (Tracy et al., 1990). Экспрессия ОК свидетельствует об окончательной дифференцировке остеобластов. В наших экспериментах экспрессия ОК была обнаружена только в клетках КМ, подвергнутых дифференцировке, на 14-е сут. Наиболее специфичным маркером поздней стадии дифференцировки в направлении остеогенеза является КС (Chen et al., 1992). Его экспрессия характерна только для стадии минерализации матрикса клеток. В клетках КМ, подвергнутых дифференцировке, была обнаружена экспрессия КС на 21-е и 28-е сут культивирования в индукционной среде. В клетках, выделенных из ПЖК, продуктов экспрессии этих генов не выявлено даже на 28-е сут индукции, несмотря на то что окраска по von Kossa продемонстрировала минерализацию матрикса в них.

Наши результаты согласуются с данными, полученными в других лабораториях (Winter et al., 2003; Lee et al., 2004; Im et al., 2005), которые свидетельствуют о том, что клетки, выделенные из КМ, обладают большим потенциалом к дифференцировке в клетки костной и хрящевой тканей. Однако есть и другие данные, которые свидетельствуют о равноценности ММСК КМ и ПЖК по способности дифференцироваться в направлении остеогенеза (Dragoo et al., 2003; Hattori et al., 2004).

Таким образом, несмотря на схожесть фенотипа популяций, выделенных из КМ и ПЖК, эти клетки обладают разными характеристиками, в том числе потенциальными дифференцироваться в направлении остеогенеза. Сравнительный анализ уровня экспрессии генов-маркеров остеогенеза в ММСК из двух разных источников показал, что клетки, выделенные из КМ, являются более перспективным источником при моделировании костной ткани *in vitro*.

### Список литературы

- Тепляшин А. С., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Чутикова Н. И., Ростовская М. С., Савченкова И. П. 2005а. Характеристика мезенхимальных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани. Цитология. 47 (2) : 130—135.
- Тепляшин А. С., Чутикова Н. И., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Ростовская М. С., Топчиашивили З. А., Савченкова И. П. 2005б. Сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам,

выделенных из разных участков подкожно-жировой клетчатки. Цитология. 47 (7) : 637—643.

Barry F. P., Boynton R. E., Haynesworth S., Murphy J. M., Zaia J. 1999. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). Biochem. Biophys. Res. Commun. 265 : 134—139.

Bruder S. P., Ricalton N. S., Boynton R. E., Connolly T. J., Jaiswal N., Zaia J., Barry F. P. 1998. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. J. Bone Miner. Res. 13 : 655—663.

Caterson E. J., Nesti L. J., Danielson K. G., Tuan R. S. 2002. Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion and analysis of differentiation. Mol. Biotechnol. 20 : 245—256.

Chen J., Shapiro H. S., Sodek J. 1992. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralization connective tissues. J. Bone Miner. Res. 7 : 987—997.

De Ugarte D. A., Morizono R., Elbarbary A., Alfonso Z., Zuk P. A., Zhu M., Dragoo J. L., Ashjian P., Thomas B., Benhaim P., Chen L., Fraser J., Hedrick M. H. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cell Tissues Organs. 174 : 101—109.

Dragoo J. L., Choi J. Y., Lieberman J. R., Huang J., Zuk P. A., Zhang J., Hedrick M. H., Benhaim P. 2003. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. J. Orthopaedic Res. 21 : 622—629.

Hattori H., Sato M., Masuoka K., Ishihara M., Kikuchi T., Matsui T., Takase B., Ishizuka T., Kikuchi M., Fujikawa K., Ishihara M. 2004. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. Cells Tissues Organs. 178 : 2—12.

Haynesworth S. E., Baber M. A., Caplan A. I. 1992. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone. 13 : 69—80.

Im G. I., Shin Y. W., Lee K. B. 2005. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? Osteoarthritis Cartilage. 13 : 845—853.

Kneser U., Schefer D. J., Polykandriotis E., Horch R. E. 2006. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. J. Cell. Mol. Med. 10 : 7—19.

Lee R. H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H. S., Suh K., Bae Y. S., Yung J. S. 2004. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone and adipose tissue. Cell Physiol. Biochem. 14 : 311—324.

Logeart-Avramoglou D., Anagnostou F., Bizios R., Petite H. 2005. Engineering bone: challenges and obstacles. J. Cell. Mol. Med. 9 : 72—84.

Mark M. P., Prince C. W., Oosawa T., Gay S., Bronckers A. L. J., Butler W. T. 1987. Immunohistochemical demonstration of 44-Kd phosphoprotein in developing rat bones. J. Histochem. Cytochem. 35 : 707—715.

Owen T. A., Aronow M. A., Shalhoub V., Barone L. M., Wilming L., Tassinari M. S. 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in the expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J. Cell. Physiol. 143 : 420—430.

Puchtler H., Meloan S. N. 1978. Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. Histochemistry. 56 : 177—185.

Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodia L., Verfaille C. M. 2001. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood. 98 : 2615—2625.

Simmons, Torok-Strob. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood. 78 : 55—62.

Tracy R. P., Andrianorivo A., Riggs B. L., Mann K. G. 1990. Comparison of polyclonal and monoclonal antibody-based immunoassays for osteocalcin: a study of sources of variation in assay results. J. Bone Miner. Res. 5 : 451—461.

Winter A., Breit S., Parsch D., Benz K., Steck E., Hauner H., Weber R. M., Ewerbeck V., Richter W. 2003. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. Arthritis Rheum. 48 : 418—429.

Yao K. L., Todescan J. R., Sodek J. 1994. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. J. Bone Miner. Res. 9 : 231—240.

Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., deUgarte D. D., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraiser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is source of multipotent stem cells. Mol. Biol. Cell. 13 : 4279—4295.

Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J. I., Futrell W. J., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multi-lineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7 : 211—226.

Поступила 13 XII 2007

#### OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS OF BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE

I. P. Savchenkova,<sup>1</sup> M. S. Rostovskaya,<sup>2</sup> N. I. Chupikova,<sup>2</sup> S. Z. Sharifullina,<sup>2</sup> A. S. Teplyashin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ya. R. Kovalenko All-Russian State Research Institute of Experimental Veterinary RAAS and <sup>2</sup> Institute of Stem Cell, Moscow; e-mail: S-IP@mail.ru

Cellular populations with phenotype similar to multipotent mesenchymal stromal cells have been isolated from two different sources: a human bone marrow and adipose tissue. The comparative analysis of differentiation efficiency of these cells in the direction of osteogenesis revealed morphological changes confirmed by Alizarin red and von Kossa staining in bone marrow cells on the 14<sup>th</sup> day, and in adipose tissue cells on the 28<sup>th</sup> day of culturing in the medium with inductors. The analysis of *osteopontin*, *osteocalcin* and *bone sialoprotein* gene expression in RT-PCR reactions detected essential distinctions in the potency of these cells to differentiate into bone tissue cells.

**Key words:** multipotent mesenchymal stromal cells, bone marrow, adipose tissue, differentiation, osteogenesis, *in vitro*, gene expression.