

АДИПОЦИТАРНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В ПРИСУТСТВИИ РОЗИГЛИТАЗОНА

© А. В. Ревитцер,¹ * Ю. А. Негуляев^{1,2}

¹Кафедра медицинской физики С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251, и

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: eetytnet@gmail.com

Существуют протоколы адипоцитарной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) с поэтапным добавлением в питательные среды различных индукторов, в том числе и селективного агониста рецептора PPAR γ розиглитазона, который, по данным из литературы, способен повышать эффективность этой дифференцировки *in vitro*. Однако протокол с участием розиглитазона до сих пор не использовали для адипоцитарной дифференцировки эмбриональных МСК костного мозга (КМ) (эМСК-КМ). В настоящей работе в качестве эМСК-КМ использована клеточная линия FetMSC и представлены результаты ее адипоцитарной дифференцировки с использованием розиглитазона. Доля клеток, прошедших адипоцитарную дифференцировку, составила $31.0 \pm 1.9\%$ (окраска масляным красным, $n = 1121$). Экспрессия гена PPAR γ , одного из главных регуляторов адипогенеза, увеличивалась в процессе адипоцитарной дифференцировки. Таким образом, продемонстрировано, что эМСК-КМ формируют адипоциты *in vitro* в присутствии розиглитазона в дифференцировочной среде.

Ключевые слова: стволовые клетки человека, фетальные стволовые клетки костного мозга человека, адипоцитарная дифференцировка, розиглитазон, экспрессия генов.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки, КМ — костный мозг, эМСК-КМ — эмбриональные МСК-КМ, ОТ — обратная транскрипция, п. н. — пара нуклеотидов, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, HDAC — гистон-деацетилаза, PPAR γ — транскрипционный фактор гамма-рецептора, активируемый пролифераторами пероксисом человека. Pparg — транскрипционный фактор гамма-рецептора, активируемый пролифераторами пероксисом мыши.

Стволовые клетки человека обладают такими свойствами, как пластичность и способность к самообновлению, и поэтому активно изучаются в настоящее время. Научным сообществом описаны стволовые клетки, выделенные из различных тканей человека, индуцированные стволовые клетки и эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Впервые мезенхимные стволовые клетки (МСК) были выделены из ткани костного мозга (КМ) взрослого человека (см. обзор: Friedenstein, 1990) и вскоре стали использоваться в регенеративной медицине. МСК-КМ обладают уникальными свойствами — способностью мигрировать в поврежденные участки ткани и продуцировать биоактивные молекулы (Polmeri et al., 2016). Но есть и сложности в работе с МСК-КМ. Качество и количество получаемых клеток зависят от процесса выделения, кроме этого, МСК-КМ имеют ограниченный потенциал деления и могут вызывать иммунный ответ при трансплантации от донора к пациенту (Polmeri et al., 2016). Альтернативой МСК-КМ взрослого организма служат МСК-КМ, выделенные из костного мозга эмбриона человека возраста 5—12 нед (эМСК-КМ), которые используются в качестве материала для клеточной терапии и регенеративной

медицины (O'Donoghue, Fisk, 2004; Balbi, Bollini, 2017; Witt et al., 2017). Показано, что эМСК-КМ обладают как общими с ЭСК и вМСК-КМ, так и отличными от них свойствами, что говорит об их промежуточном между ЭСК и вМСК-КМ фенотипе. По сравнению с ЭСК эМСК-КМ имеют более ограниченный потенциал деления, но не формируют тератомы *in vitro*, что снижает риск развития злокачественного образования после трансплантации *in vivo*. Интересно, что эМСК-КМ, как и ЭСК, экспрессируют маркеры клеточной плюрипотентности (Baghbaderani et al., 2008). Но по сравнению с вМСК-КМ, у эМСК-КМ активнее функционирует теломераза, поэтому эМСК-КМ имеют более высокий потенциал деления. Другим важным преимуществом эМСК-КМ перед вМСК-КМ является то, что они не отторгаются при трансплантации; однако это справедливо только для ЭСК, выделенных до 12 нед внутриутробного развития (O'Donoghue, Fisk, 2004).

Для эМСК-КМ, как и для любых МСК, показана способность дифференцироваться в адипогенном направлении *in vitro* (Крылова и др., 2012). Адипоцитарная дифференцировка МСК *in vitro* является доступным и относитель-

льно простым инструментом для изучения адипогенеза и жировых клеток. Интерес к изучению жировых клеток достаточно велик, он растет с увеличением знаний об эндокринной функции жировой ткани в организме в норме и патологии (Turner et al., 2017). Показано, что различные заболевания (ожирение, диабет, хроническая сердечная недостаточность и остеопороз) сопровождаются нарушениями липолиза, липогенеза и адипогенеза (Bredella et al., 2011; Wongdee, Charoenphandhu, 2011; Wang et al., 2014). Адипогенез — это сложный и многокомпонентный процесс, вовлекающий в себя взаимодействие нескольких транскрипционных факторов (Rosen, Spiegelman, 2000; Rosen, MacDougald, 2006), таких как СЕВРВ, СЕВРР и РРАРР. РРАРР является рецептором ядерной мембраны и транскрипционным фактором, входящим в семейство рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами. Этот рецептор играет центральную роль в адипогенезе (Kawai, Rosen, 2010), поскольку нокаут по гену *Pparg* у мышей ведет к полному отсутствию у них жировой ткани (Kubota et al., 1999).

Известно, что РРАРР связывается с лигандом, после чего образует гетеродимер с другим лигандактивируемым ядерным рецептором ретиноидов — Х типа альфа. Этот гетеродимер связывается со специфической последовательностью в ДНК и активирует транскрипцию генов-мишеней (Willson et al., 2001; Farmer, 2006). *PPARG* экспрессируется в жировой ткани, также экспрессия *PPARG* обнаружена в вМСК-КМ (Tontonoz et al., 1994a; Revittser et al., 2014). При адипоцитарной дифференцировке *in vitro* используются различные протоколы, в том числе предусматривающие использование лигандов РРАРР.

Одним из этих лигандов РРАРР является химическое вещество класса тиазолидиндионов — розиглитазон, селективный агонист рецептора РРАРР (Zebisch et al., 2012). Показано, что розиглитазон способен увеличивать эффективность адипоцитарной дифференцировки фибробластов *in vitro* (Tontonoz et al., 1994b), но в литературе нет данных об использовании питательных сред, включающих в себя розиглитазон, для адипоцитарной дифференцировки эМСК-КМ.

Целью нашей работы было выяснить, способна ли дифференцировочная питательная среда, содержащая розиглитазон, стимулировать адипоцитарную дифференцировку *in vitro* эМСК-КМ линии FetMSC (Крылова и др., 2012), полученной из 5—6-недельного эмбриона. В процессе адипоцитарной дифференцировки измерены уровни экспрессии гена *PPARG*, одного из важнейших регуляторов адипогенеза.

Материал и методика

Клеточная линия. Для работы использовали линию клеток МСК (FetMSC), выделенную из КМ эмбриона человека из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П) Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Эти клетки были получены и охарактеризованы ранее Крыловой с соавторами и была показана их способность к дифференцировке в адипогенном направлении (Крылова и др., 2012). Клетки культивировали в среде α -МЕМ (Биолот, Россия), содержащей 10 % сыворотки плодов коровы (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин, смесь пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (Биолот, Россия). Среду меняли 1 раз в 2—3 сут.

Определение статуса клеток с помощью проточной цитофлуометрии. Клетки культивировали в течение 5 сут, снимали с поверхности с помощью 0.05%-ного раствора трипсина с версеном (Биолот, Россия) и отмывали от него раствором PBS (Хеликон, Россия). Полученную суспензию клеток (1 млн/мл) аликвотировали на пробы 30 мкл, добавляли к каждой из них по 3 мкл антител, конъюгированных с флуоресцентными метками — FITC или фиткозретрин (PE), — и инкубировали их при 4 °C в течение 30 мин. Далее пробы доводили до объема 0.4 мл с помощью буфера FACS (PBS, содержащий 1 % BSA и 0.05 % азида натрия). Цитофлуометрический анализ проводили с помощью цитометра Beckman Coulter (США), использовали антитела CD44, CD73, CD90, CD105 и CD146 (Beckman Coulter, США). Каждый эксперимент проводили 1 раз.

Для направленной адипоцитарной дифференцировки использовали индукторы из протокола, описанного для клеточной линии 3T3-L1 (*Mus musculus*) (Zebisch et al., 2012). Клетки высевали в чашку Петри при плотности 10 000 на 1 см² в среду α -МЕМ (Биолот, Россия), содержащую 10 % сыворотки плодов коровы (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин, смесь пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (Биолот, Россия). Среду меняли 1 раз в 2—3 сут. Когда клетки достигали субконфлюэнтности, мы заменяли используемую среду средой с индукторами, содержащей 0.5 мМ изобутилметилксантина, 0.5 мкМ дексаметазона и 2 мкМ розиглитазона (все от Sigma, США). Эта среда сохранялась первые 4 сут. В дальнейшем розиглитазон не добавляли. На 4—8-е сут использовали среду, содержащую 1 мкг/мл инсулина (Sigma, США). На 8—2-е сут использовали среду без индукторов. Для выявления дифференцировки клетки промывали PBS, фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре и окрашивали красным масляным (Oil Red O, Sigma, США) в течение 15 мин, затем промывали дистиллированной водой. Микроскопический контроль проводили с использованием инвертированного микроскопа Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия).

Выделение РНК. Образцы суммарной РНК собирали на разных этапах эксперимента: из субконфлюэнтной культуры FetMSC на 4, 8 и 12-е сут после начала адипоцитарной дифференцировки. Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasyMiniKit (QIAGEN, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Элюцию проводили в 30 мкл дважды дистиллированной воды (ddH₂O). Концентрацию выделенной РНК измеряли на спектрофотометре GeneQuant1300 (Biochrom, США).

Обратная транскрипция (ОТ). Синтез кДНК проводили с помощью набора для обратной транскрипции ОТ-1 (Синтол, Россия). Для реакции ОТ использовали 1 мкг РНК, 1 мкл праймера (Random-6 15 ОЕ/мл) и ddH₂O, общий объем реакционной смеси составлял 13 мкл. Далее эту смесь инкубировали при 65 °C 10 мин и охлаждали 1 мин во льду. Добавляли 10 мкл 2.5-кратной реакционной смеси и 1 мкл обратной транскриптазы (MMLV-RT 50 ед./мкл). Общую смесь инкубировали 75 мин при 37 °C и 10 мин при 85 °C. К полученной кДНК добавляли 75 мкл ddH₂O.

ПЦР после ОТ. Праймеры для ПЦР были спроектированы с помощью программы PrimerBlast (США) с учетом базы данных нуклеотидной последовательности NCBI. Геном интереса был *PPARG*. В качестве референсного гена был выбран *GAPDH* (Gorzelnik et al., 2001).

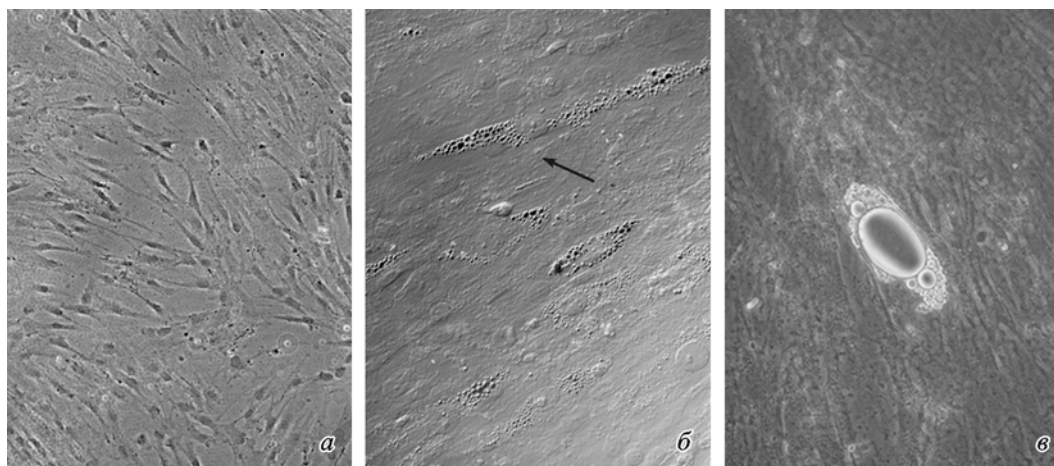


Рис. 1. Адипоцитарная дифференцировка клеток линии FetMSC. Розиглитазон (2 мкМ) добавляли в течение первых 4 сут дифференцировки.

a — недифференцированные клетки линии FetMSC; *б, в* — FetMSC на 12-е сут адипоцитарной дифференцировки, *стрелка (б)* показывает липидные капли, окрашенные масляным красным. *a, в* — фазовый контраст; *б* — дифференциально-интерференционный контраст. *a, б* — фиксированный препарат; *в* — прижизненная микроскопия. Об. 20× (*a*), 63× (*б*) и 40× (*в*).

Последовательности праймеров для *PPARG*: прямой 5'-CGAGGGCGATCTTGACAG-3' и обратный 3'-TCTTTGCTCTGCTCCTG-5' (размер ампликона 130 п. н.). Последовательности праймеров для *GAPDH*: прямой 5'-AATGAAGGGGTCAATGATGG-3' и обратный 3'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-5' (размер ампликона 108 п. н.). Последовательности, комплементарные полученным праймерам, находятся в разных экзонах гена и тем самым обеспечивают специфичность амплификации кДНК. ПЦР проводили в объеме 10 мкл, в который входили: 4 мкл разведенной кДНК, по 0.5 мкМ прямого и обратного праймеров, 0.2 мМ дНТФ, 1.5 мМ MgCl₂, Hot-*Taq* полимеразный буфер и 1 ед. Hot-*Taq* ДНК-полимеразы (Силекс, Россия). В качестве отрицательного контроля ПЦР проводили с использованием реакционной смеси без ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили в следующем режиме: 95 °С в течение 5 мин (активация полимеразы), далее 35 2-стадийных циклов (60 °С, 50 с и 95 °С, 15 с). Продукты ПЦР в объеме 8 мкл электрофоретически разделяли в 6%-ном ПААГ, затем окрашивали бромистым этидием. Фотографировали при ультрафиолетовом свете.

ПЦР в реальном времени. Использовали амплификатор ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, США) и ПЦР-комплект (R-414, Синтол, Россия). Реакцию проводили в объеме 25 мкл. Она включала в себя 4 мкл разведенной матрицы кДНК, 250 мкМ дНТФ, 2.5 мкл 10-кратного буфера Б для ПЦР (содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green I и референсный краситель ROX), 25 мМ MgCl₂, 1 ед. *Syn Taq* ДНК-полимеразы, по 5 мкМ прямого и обратного праймеров, ddH₂O. Для выбора оптимальных условий реакции оценивали эффективность ПЦР в реальном времени методом последовательных разведений препаратов кДНК. Температурный профиль амплификации был следующим: 95 °С, 5 мин и далее 40 циклов при 60 °С, 50 с (детекция флуоресцентного сигнала) и 95 °С, 15 с. Затем строили кривую плавления в диапазоне температур 60—95 °С. Все кривые плавления имели один пик, что говорит о специфичности подобранных праймеров. Обработку полученных результатов проводили с помощью программ ABI Prism (Applied Biosystems, США) и

Excel (Microsoft, США), используя метод $\Delta\Delta C_t$ (Livak, 2001). Все результаты представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок (*n* — число экспериментов), статистически значимые результаты выявляли с помощью стандартного парного *t*-критерия Стьюдента. Различия между относительными уровнями РНК недифференцированных клеток FetMSC и уровнями РНК клеток FetMSC на 4, 8 и 12-е сут адипоцитарной дифференцировки считали значимыми при $P < 0.05$.

Результаты

Статус клеток. В отличие от авторов полученной линии FetMSC (Крылова и др., 2012) мы культивировали клетки не в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия), а в среде α -MEM. Поэтому мы выясняли, влияет ли смена среды культивирования на экспрессию поверхностных антигенов, характерных для МСК человека. Проточная цитометрия с использованием соответствующих антител показала, что клетки линии FetMSC в среде α -MEM экспрессируют поверхностные маркеры мезенхимного ряда: CD44 (99.8%), CD73 (99.8%), CD90 (100.0%), CD105 (100.0%) и CD146 (99.8%) (*n* = 1). Эти данные указывают на сохранение мезенхимного статуса клеток в измененных условиях культивирования.

Адипоцитарную дифференцировку FetMSC проводили в течение 12 сут (Zebisch et al., 2012). Основные результаты были получены на 6-м пассаже.

Результаты микроскопического контроля FetMSC в процессе адипоцитарной дифференцировки представлены на рис. 1. Для получения изображений использовали объектив с фазовым контрастом. На рис. 1, *a* показаны недифференцированные клетки FetMSC с классической веретеновидной формой, характерной для стволовых клеток (Крылова и др., 2012). На рис. 1, *б, в*, полученном на 12-е сут дифференцировки, видно изменение морфологии клеток — появление липидных капель.

Для подтверждения дифференцировки на 12-е сут мы окрашивали клетки масляным красным (рис. 1, *б*). Под микроскопом с помощью фазового контраста наблюдали

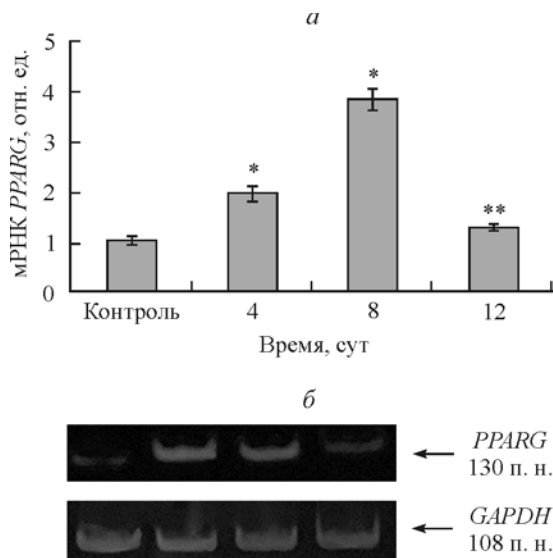


Рис. 2. Экспрессия мРНК гена *PPARG* в клетках FetMSC в процессе адипоцитарной дифференцировки.

а — уровень мРНК *PPARG* (ПЦР в реальном времени, нормализовано по *GAPDH*, метод $\Delta\Delta Ct$); представлены средние значения и их стандартная ошибка; отличие от контроля достоверно при $P < 0.005$ (одна звездочка) и $P < 0.05$ (две звездочки). *б* — экспрессия мРНК *PPARG* (относительно *GAPDH*), ОТ-ПЦР, стрелка показывает молекулярную массу продуктов ПЦР.

более крупные липидные капли (рис. 1, *в*), а при дифференциально-интерференционном контрасте хорошо различали мелкие липидные капли (рис. 1, *б*, стрелка). Для количественной оценки эффективности адипоцитарной дифференцировки считали все клетки в поле зрения микроскопа и клетки с липидными каплями, окрашенные масляным красным, а далее находили их процентное отношение (Liu et al., 2016). Доля дифференцированных клеток составила $31.0 \pm 1.9\%$ ($n = 1121$) и свидетельствует о наличии в культуре адипоцитов.

Экспрессия *PPARG*. Для дополнительного подтверждения адипоцитарной дифференцировки измеряли уровень экспрессии *PPARG* с помощью ПЦР в режиме реального времени в недифференцированных клетках FetMSC и на 4, 8 и 12-е сут их дифференцировки (рис. 2). В качестве референсного гена использовали *GAPDH* (Gorzelnik et al., 2001). Интересно отметить, что экспрессию *PPARG* наблюдали и у недифференцированных FetMSC (рис. 2, *а*). В процессе дифференцировки клеток на 4-е сут экспрессия *PPARG* возросла в 2 раза (2.01 ± 0.14 , $n = 3$) и еще более — на 8-е сут (3.84 ± 0.22 , $n = 3$). Однако через 12 сут дифференцировки экспрессия *PPARG* снижалась (1.28 ± 0.06 , $n = 3$). Результаты ПЦР в режиме реального времени были подтверждены результатами проведенного классического ОТ-ПЦР (рис. 2, *б*). В отрицательных контролях экспрессии *PPARG* обнаружено не было. Таким образом, в процессе адипоцитарной дифференцировки клеток FetMSC наблюдали изменение экспрессии *PPARG*.

Обсуждение

Цитометрическое фенотипирование показало, что при культивировании в среде α -MEM клетки линии FetMSC сохраняют экспрессию поверхностных белков,

характерных для мезенхимных клеток. Полученные нами данные согласуются с результатами Крыловой и соавторов (2012). Тем не менее неизвестно, как изменение условий культивирования повлияло на способность FetMSC к адипоцитарной дифференцировке. Мы считаем, что влияние смены среды минимально, так как среда α -MEM используется для культивирования взрослых МСК-КМ без потери характерных для них свойств (Meuleman et al., 2006).

Результаты показали, что полученный в процессе адипоцитарной дифференцировки FetMSC профиль экспрессии *PPARG* (человека) (рис. 2) имеет сходство с профилем экспрессии *Pparg* (мыши) в процессе дифференцировки этой же направленности клеток линии 3T3-L1 (Ntambi et al., 2000; Watanabe et al., 2003). При дифференцировке клеток линии 3T3-L1 в адипоцитарном направлении *in vitro* обнаружено, что экспрессия *Pparg* стимулируется в течение 2 сут адипоцитарной дифференцировки за счет связывания с промотором *Pparg* транскрипционных факторов СЕВРВ и СЕВРР (Darlington et al., 1998). В свою очередь гетеродимер PPARG связывается с промотором *Cebpa* и активирует его экспрессию. СЕВРА (CCAAT/enhancer binding protein alpha) может связываться с промотором *Pparg* и активировать экспрессию *Pparg* по механизму положительной обратной связи. Таким образом, эти два транскрипционных фактора взаимно регулируют друг друга, и в результате экспрессия *Pparg* достигает максимума примерно через 4 сут дифференцировки в мышечных клетках 3T3-L1 (Ntambi, Young-Cheul, 2000), как и в наших экспериментах с клетками FetMSC человека (рис. 2).

Известно, что PPARG активирует экспрессию генов, кодирующих специфичные белки и ферменты, необходимые клетке для достижения адипоцитарного фенотипа. Поэтому через 5—7 сут клетки 3T3-L1 формируют жировые капли и приобретают фенотип дифференцированных адипоцитов (Watanabe et al., 2003). В наших экспериментах накопление жировых капель в клетках FetMSC происходило на 7—8-е сут. Ранее показано, что активность транскрипции *Pparg* регулируется модификацией гистонов (Guan et al., 2005). В отсутствие лигандов рецептора PPARG к белковому комплексу PPARG рекрутируется гистондеацетилаза (HDAC), блокируется транскрипция, поэтому в клетках 3T3-L1 наблюдается снижение экспрессии *Pparg* через 4 сут адипоцитарной дифференцировки. В наших экспериментах обнаружено, что экспрессия *PPARG* на 12-е сут дифференцировки ниже, чем на 4-е (рис. 2).

В наших экспериментах с FetMSC доля дифференцированных клеток составила $31.0 \pm 1.9\%$. Согласно данным из литературы, при дифференцировке взрослых МСК-КМ можно получить большую долю адипоцитов — до 95% (Pittenger et al., 1999), однако это значение может варьировать в зависимости от конкретной клеточной линии в МСК-КМ. Предполагается, что это связано с гетерогенностью взрослых МСК-КМ, а именно с присутствием в них коммитированных предшественников адипоцитов и остеобластов (Post, 2008; Abdallah et al., 2015). Коммитированные предшественники адипоцитов формируют адипоциты при запуске адипоцитарной дифференцировки *in vitro*, в то время как коммитированные предшественники остеобластов — нет (в том числе и в присутствии розиглитазона в дифференцировочной среде). В настоящее время ведется поиск поверхностных маркеров для разделения различных предшественников, а в качестве одного

из потенциальных маркеров предлагают CD34 (Abdallah et al., 2015). Мы предполагаем, что небольшой показатель дифференцировки в наших экспериментах объясняется присутствием в культуре FetMSC различных субпопуляций.

В утробе матери эмСК-КМ не формируют жировой ткани в КМ (Kawai et al., 2010), тем не менее мы показали, что *PPARG* экспрессируется в недифференцированных FetMSC. Более того, морфология клеток и уровни экспрессии *PPARG* меняются в процессе адипоцитарной дифференцировки, и происходит формирование адипоцитов. Эти результаты указывают на присутствие транскрипционного фактора *PPARG* в FetMSC, который может активироваться розиглитазоном. Розиглитазон является лекарственным препаратом и применяется при лечении диабета 2-го типа для увеличения чувствительности тканей к инсулину (Olefsky, 2000). Розиглитазон используется в качестве лекарственного средства и для беременных женщин, страдающих диабетом 2-го типа и диабетом беременных (Yaris et al., 2004; Kalyoncu et al., 2005), у которых повышенное содержание глюкозы в крови коррелирует с увеличенным риском развития патологий и смерти плода (Landon, Gabbe, 1999).

С другой стороны, использование розиглитазона ассоциировано с рядом побочных эффектов — увеличением веса у детей и взрослых, снижением костной плотности и увеличением количества жировой ткани в костном мозге (Russo et al., 2016). Кроме того, на животной модели (*Ovis aries*, домашняя овца) показано, что розиглитазон способен проходить через плаценту и накапливаться в крови эмбриона и плода, приводя к нарушению его нормального развития (Bazargan et al., 2016). В настоящее время неизвестно, как влияет розиглитазон на ткани человека *in utero* и может ли он, связываясь с *PPARG*, вызывать какие-либо побочные эффекты. Таким образом, клетки FetMSC могут быть относительно доступной моделью для изучения *in vitro* возможного влияния розиглитазона и других лекарственных средств на клетки КМ эмбриона и плода человека. Мы продемонстрировали, что клетки FetMSC формируют адипоциты *in vitro* и что недифференцированные FetMSC экспрессируют *PPARG*, кодирующий один из важнейших транскрипционных факторов адипогенеза.

Авторы выражают благодарность С. Б. Семенов и И. О. Васильевой (Институт цитологии РАН) за помощь при подготовке рукописи к печати.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-00952).

Список литературы

Крылова Т. А., Кольцова А. М., Зенин В. В., Мусорина А. С., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. 54 (1) : 5—16. (Krylova T. A., Koltsova A. M., Zenin V. V., Musorina A. S., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2012. Comparative characteristics of new mesenchymal stem cell lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow and foreskin. Tsitologiya. 54 (1) : 5—16.)

Abdallah B. M., Al-Shammary A., Skagen P., Abu Dawud R., Adjaye J., Aldahmash A., Kassem M. 2015. CD34 defines an osteo-

progenitor cell population in mouse bone marrow stromal cells. Stem Cell Res. 15 : 449—458.

Baghbaderani B. A., Behie L. A., Sen A., Mukhida K., Hong M., Mendez I. 2008. Expansion of human neural precursor cells in large-scale bioreactors for the treatment of neurodegenerative disorders. Biotechnol. Prog. 24 : 859—870.

Balbi C., Bollini S. 2017. Fetal and perinatal stem cells in cardiac regeneration: moving forward to the paracrine era. Placenta. 59 : 96—106.

Bazargan M., Foster D. jr., Muhlhauser B. S., Morrison J. L., McMillen C., Davey A. K. 2016. Limited fetal metabolism of rosiglitazone: Elimination via the maternal compartment in the pregnant ewe. Reproduct. Toxicol. 61 : 162—168.

Bredella A. M., Torriani M., Ghomi R. G., Thomas B. J., Danielle J., Brick D. J., Gerweck A. V., Rosen C. J., Klibanski A. A., Karen K. M. 2011. Vertebral bone marrow fat is positively associated with visceral fat and inversely associated with IGF-1 in obese women. Obesity (Silver Spring). 19 : 49—53.

Darlington G. J., Ross S. E., MacDougald O. A. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. J. Biol. Chem. 273 : 30 057—30 060.

Farmer S. R. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. Cell Metab. 4 : 263—273.

Friedenstein A. J. 1990. Osteogenic stem cells in bone marrow. In: Bone and mineral research. Amsterdam: Elsevier. 243—272.

Gorzelnia K., Janke J., Engeli S., Sharma A. M. 2001. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. Horm. Metab. Res. 33 : 625—627.

Guan H. P., Ishizuka T., Chui P. C., Lehrke M., Lazar M. A. 2005. Corepressors selectively control the transcriptional activity of *PPARG* in adipocytes. Genes Develop. 19 : 453—461.

Kalyoncu N. I., Yaris F., Ulku C., Kadioglu M., Kesim M., Unsal M., Dikici M., Yaris E. 2005. A case of rosiglitazone exposure in the second trimester of pregnancy. Reprod. Toxicol. 19 : 563—564.

Kawai M., Rosen C. J. 2010. *PPARG*: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. Nat. Rev. Endocrinol. 6 : 629—636.

Kawai M., Sousa K. M., MacDougald O. A., Rosen C. J. 2010. The many facets of *PPARG*: novel insights for the skeleton. Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 299 : 299—318.

Kubota N., Terauchi Y., Miki H., Tamemoto H., Yamauchi T., Komada K. 1999. *PPAR* gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Mol. Cell. 4 : 597—609.

Landon M. B., Gabbe S. G. 1999. Diabetes in pregnancy. In: High risk pregnancy: management options. London: WB Saunders. 665—684.

Liu G. P., Liao C. H., Xu Y. P. 2016. Proliferation and adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells isolated from middle-aged patients with prominent orbital fat in the lower eyelids. Plast. Aesthet. Res. 3 : 322—327.

Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. Methods. 25 : 402—408.

Meuelman N., Tondreau T., Delforge A., Dejenefte M., Massey M., Libertalis M., Bron D., Laqueaux L. 2006. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. Eur. J. Haematol. 76 : 309—316.

Ntambi J. M., Young-Cheul K. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. J. Nutr. 130 : 3122S—3126S.

O'Donoghue K., Fisk N. M. 2004. Fetal stem cells. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 18 : 853—875.

Olefsky J. M. 2000. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. J. Clin. Invest. 106 : 467—472.

Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 284 : 143—147.

- Polimeri A., Giannobile W. V., Kaigler D. 2016. Bone marrow stromal stem cells in tissue engineering and regenerative medicine. *Horm. Metab. Res.* 48 : 700—713.
- Post S., Abdallah B. M., Bentzon J. F., Kassem M. 2008. Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone.* 43 : 32—39.
- Revittser A., Pivovarova O., Rudovich N., Pfeiffer A. F. H., Shlyakto E., Dmitrieva R. 2014. PPAR γ and natriuretic peptides (NP) pathway are altered in adipose tissue from heart failure patients/mesenchymal stromal cells (MMSC) as a tool to study cardiovascular metabolic disorders *in vitro*. *Cardiovascular Res.* 103 : s105.
- Rosen E. D., MacDougald O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 : 885—896.
- Rosen E. D., Spiegelman B. M. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 16 : 145—171.
- Russo G. T., Giandalia A., Romeo E. L., Nunziata M., Muscianni M., Ruffo M. C., Catalano A., Cucinotta D. 2016. Fracture risk in type 2 diabetes: Current Persp. *Gender Differ. Int. J. Endocrinol.* 1615—1735.
- Tontonoz P., Hu E., Graves R. A., Budavari A. I., Spiegelman B. M. 1994a. mPPAR γ 2 : tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Develop.* 10 : 1224—1234.
- Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M. 1994b. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 79 : 1147—1156.
- Turner P. A., Gurumurthy B., Bailey J. L., Elks C. E., Janorkar A. V. 2017. Adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells grown as spheroids. *Proc. Biochem.* 59 : 312—320.
- Wang L., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E. M., Blunder M., Liu X., Malainer C., Blazevic T., Schwaiger S., Rollinger J. M., Heiss E. H., Schuster D., Kopp B., Bauer R., Stuppner H., Dirsch V. M., Atanasov A. G. 2014. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): a review. *Biochem. Pharmacol.* 92 : 73—89.
- Watanabe M., Inukai K., Katagiri H., Awata T., Oka Y., Katakayama S. 2003. Regulation of PPAR γ transcriptional activity in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 : 429—436.
- Willson T. M., Lambert M. H., Kliewer S. A. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem.* 70 : 341—367.
- Witt R., MacKenzie T. C., Peranteau W. H. 2017. Fetal stem cell and gene therapy. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 22 : 410—414.
- Wongdee K., Charoenphandhu N. 2011. Osteoporosis in diabetes mellitus: possible cellular and molecular mechanisms. *World J. Diabetes.* 2 : 41—48.
- Yaris F., Yaris E., Kadioglu M., Ulku C., Kesim M., Kalyoncu N. I. 2004. Normal pregnancy outcome following inadvertent exposure to rosiglitazone, gliclazide, and atorvastatin in a diabetic and hypertensive woman. *Reprod. Toxicol.* 18 : 619—621.
- Zebisch K., Voigt V., Wabitsch M., Brandsch M. 2012. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal. Biochem.* 425 : 88—90.

Поступила 30 XI 2017

ADIPOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN FETAL BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS USING ROSIGLITAZONE

A. V. Revittser,^{1,*} Yu. A. Neguliaev^{1,2}

¹ Department of Medical Physics Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, and

² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: eetytnet@gmail.com

The adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (MSC) *in vitro* is a common instrument for studying an adipogenesis. There are a lot of published protocols for adipogenic differentiation of MSC. For this study we have chosen the protocol with presence of rosiglitazone. Rosiglitazone is high-specific agonist of PPAR γ . It has been shown that rosiglitazone can enhance the adipogenic differentiation *in vitro*. However, the protocol for effective differentiation of cells with presence of rosiglitazone never has been used for adipogenic differentiation of fetal bone marrow derived mesenchymal stem cells (F-BM-MSC). In the present study, we showed adipogenic differentiation of F-BM-MSC *in vitro* using the protocol with presence of rosiglitazone. We saw the presence of Oil Red stained cells after differentiation ($31.0 \pm 1.9\%$). Using Real-Time PCR we found increase of PPAR γ expression during adipogenic differentiation. The results show that F-BM-MSC have formed adipocytes *in vitro*.

Key words: human stem cells, human fetal bone marrow stem cells, adipogenic differentiation, rosiglitazone, gene expression.