

## Поэтапная дифференцировка в остеогенном направлении мультипотентных клеток жировой ткани мышей<sup>#</sup>

## Stepwise Differentiation of Multipotent Cells from Murine Adipose Tissue in Osteogenic Direction<sup>#</sup>

Известно, что в эмбриогенезе формирование скелета происходит за счет внутримембранной оссификации клеток и окостенения его хрящевой основы с предварительным образованием узелков оссификации. Несмотря на то, что при этих процессах большинство клеток хрящевой ткани отмирает, замещаясь ранними остеопрогениторами, было установлено, что часть из них остается, внося свой вклад в развитие костной ткани [6]. В нашей работе показано, что остеодифференцировка мультипотентных стромальных клеток из жировой ткани (МСК ЖТ) мышей с предварительной их хондроиндукцией увеличивает количество узелков оссификации клеток *in vitro*.

В данной работе проведен сравнительный анализ направленной остеогенной дифференцировки МСК ЖТ мышей *in vitro* по стандартному протоколу и поэтапной их дифференцировки.

Фрагменты подкожной жировой клетчатки получали от 3-месячных самцов мышей линии FVB дикого типа, тщательно отмывали от крови в растворе питательной среды RPMI-1640 с антибиотиками «PenStrep» ×100 (все «Sigma», США). После этого ткань переносили в раствор 0,1% коллагеназы 1А («PAA», Австрия) и инкубировали 2–2,5 ч при 37°C при постоянном перемешивании. По истечении срока ферментации действие фермента ингибировали добавлением равного объема полной питательной среды DMEM с 10% FBS (Fetal Bovine Serum, все «Sigma») и ресуспендировали до получения однородной суспензии. Клетки осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 мин. Супернатант, содержащий зрелые адипоциты, липиды и дебрис, отбрасывали, осадок ресуспендировали в питательной среде и пропускали через клеточный фильтр с диаметром пор 70 мкм. В полученной суспензии подсчитывали количество кле-

It is known that embryogenesis is accompanied by the formation of skeleton due to intramembrane ossification of cells and calcification of its cartilage matrix with pre-formation of ossification nodes. Despite the fact that during these processes the bulk of cells of cartilaginous tissue die and are replaced by early osteoprogenitors, it is established that the part of them remains intact and contributes to the development of bone tissue [6]. In our work it has been shown that osteodifferentiation of mice multipotent stromal cells from adipose tissue (AD MSCs) with their preliminary chondroinduction increases the number of cell ossification nodes *in vitro*.

In this investigation we have comparatively analyzed the directed osteogenic differentiation of mice AD MSCs *in vitro* according to the standard protocol or their stepwise differentiation.

Fragments of subdermal adipose tissue were obtained from FVB male mice of wild type (3-month-old), then thoroughly washed free of blood with solution of nutrient medium RPMI-1640 supplemented with antibiotics PenStrep×100 (both from Sigma, USA). Then the tissue was transferred into solution of 0.1% collagenase 1A (PAA, Austria) and incubated for 2–2.5 hrs at 37°C with constant mixing. After termination of fermentation the effect of enzyme was inhibited by supplementing with complete nutrient medium DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS; both from Sigma) of equal volume, after that it was resuspended until getting homogeneous. The cells were sedimented by centrifugation at 200g for 5 min. Supernatant with mature adipocytes, lipids and debris was removed, sediment was resuspended in nutrient medium and was passed through cell filter with 70 mm pores. In the obtained suspension we estimated the number of cells using the test with Trypan blue and seeded them into culture flasks (Sarstedt

ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Вышгородская, 67; Киев, Украина 04114; электронная почта: olkups@gmail.com

<sup>#</sup> Данное исследование было представлено на мини-симпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 22 мая 2012 года в г. Харькове.

<sup>1</sup>Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed: 67, Vyshgorodska str., Kyiv, Ukraine 04414; e-mail: olkups@gmail.com

<sup>#</sup>This reseach was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22<sup>nd</sup> of May, 2012.

ток в тесте с трипановым синим и высаживали в культуральные флаконы («Sarstedt Cell+», Германия) в полную питательную среду из расчета  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>. После инкубации в условиях 5% CO<sub>2</sub>, 37°C и влажном воздухе на протяжении 4 ч проводили полную замену питательной среды для культивирования и продолжали инкубировать при стандартных условиях до получения субконфлюэнтного монослоя. Для наращивания клеточной массы клетки субкультивировали на протяжении 1–2 пассажей; для деструкции монослоя использовали раствор трипсина (2000 U; «Sigma»).

Для фенотипирования культур клеток использовали моноклональные антитела к мембранным антигенам мышей, меченные флуорохромами, с соответствующим изотип-контролем: anti-CD44 PE, anti-CD73 PE, anti-CD90 PE, anti-CD34 APC, anti-CD45 PE-Cy7, anti-CD117 PE-Cy7 («Becton Dickinson», США).

Клетки инкубировали с антителами в рабочей концентрации 0,5 мкг на 10<sup>6</sup> клеток на протяжении 30 мин, центрифугировали в 1 мл раствора «BD CellWash» («Becton Dickinson») при 200 g на протяжении 5 мин, осадок дважды промывали в «CellWash» и анализировали не менее 10 000 событий с помощью проточного цитофлуориметра-сортера «BD FACS Aria» с использованием программного обеспечения «BD FACS Diva 6.1.2» («Becton Dickinson»). Для настройки компенсации перекрытия спектров эмиссии флуорохромов при многопараметрическом анализе использовали контрольные образцы клеток без внесения антител (unstained control), образцы с каждым антителом отдельно (single stained control) и образцы с комбинацией нескольких антител без одного (fluorescence minus one control).

Известно, что с возрастом потенциал клеток к дифференцировке снижается. При культивировании *in vitro* клетки стареют быстрее, чем *in vivo*. Именно поэтому для экспериментальных исследований рекомендуется использовать клетки ранних пассажей (до 4–6) [2, 5]. Для индукции остеогенной дифференцировки *in vitro* полученные МСК ЖТ на 1–2 пассаже высаживали в лунки 6-луночных планшетов из расчета  $4 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> и инкубировали до получения субконфлюэнтного монослоя. Затем культуральную среду заменяли на среду для дифференцировки. Для проведения стандартной остеоиндукции использовали ранее описанные методики [3]. В питательную среду DMEM:F12 добавляли 7% FBS и дополняли L-аскорбиновой кислотой 2-фосфатом (0,05 мМ), β-глицерофосфатом (10 мМ) и дексаметазоном (100 нМ) (все «Sigma»). Полную замену среды для остеодифференцировки проводили каждые 3–4 дня на протяжении 21 суток. Процесс поэтапной остеогенной дифференцировки заключался в том, что сначала клетки индуцировали в хондрогенном направлении, а затем – инкубировали в стандартной среде для остеогенной дифференцировки. Среду для хондрогенной диффе-

Cell+, Germany) with complete nutrient medium in an amount of  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. After incubation in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and humid air during 4 hrs we changed completely the nutrient culture medium and continued the incubation at standard conditions until subconfluent monolayer. To expand cell mass the cells were subcultured during 1–2 passages using the trypsin solution (2000 U; Sigma) for destruction of monolayer.

For phenotyping cell cultures we used monoclonal antibodies to mice membrane antigens labelled with fluorochromes and with corresponding isotope-control: anti-CD44 PE, anti-CD73 PE, anti-CD90 PE, anti-CD34 APC, anti-CD45 PE-Cy7, anti-CD117 PE-Cy7 (Becton Dickinson, USA).

The cells were incubated with antibodies in concentration of 0.5 μg for 10<sup>6</sup> cells during 30 min, then centrifuged in 1 ml BD CellWash solution (Becton Dickinson) at 200 g for 5 min, the sediment was washed twice in CellWash and not less than 10,000 events were analyzed with cell sorter FACS Aria with FACSDiva 6.1.2. software (Becton Dickinson). To adjust the compensation of overlapping fluorochrome emission spectra in multiparameter analysis we used the control samples of cells without added antibodies (unstained control), the samples with separate antibodies (single stained control) and the samples with combination of several antibodies without one (fluorescence minus one control).

It is known that with ageing the cell potential to differentiation decreases. During *in vitro* culturing the cells senescence more rapidly than *in vivo*. That is exactly why the cells of early passages (up to 4–6) are recommended for experimental investigations [2, 5]. For the induction of osteogenic differentiation *in vitro* the obtained AD MSCs at 1–2 passages were seeded into wells of 6 well plates in an amount of  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and were incubated till formation of subconfluent monolayer. Then the culture medium was changed for the medium for differentiation. Previously described methods were used to perform standard osteoinduction [3]. Nutrient medium DMEM:F12 was supplemented with 7% FBS and L-ascorbate-2-phosphate (0.05 mM), β-glycerophosphate (10 mM) and dexamethasone (100 nM) (Sigma). The medium for osteodifferentiation was completely changed every 3–4 days during 21 days. Stepwise osteogenic differentiation consisted in follows: firstly the cells were induced towards chondrogenic lineage, then the cells were incubated in standard medium for osteogenic differentiation. The medium for chondrogenic differentiation was prepared by earlier described methods [1, 5]. It contained DMEM with 7% FBS as well as L-ascorbate-2-phosphate (50 mg/ml), dexamethasone (39 ng/ml), Na pyruvate (100 mg/ml), TGF-β (10 ng/ml) and IGF-I (100 ng/ml) (Sigma). Complete change of the medium for chondrogenic differentiation was performed every 3–4 days during 10 days, thereafter the medium for standard osteogenic differentiation was

ренцировки готовили по ранее описанным методикам [1, 5]. Она состояла из DMEM с добавлением 7% FBS, а также L-аскорбиновой кислоты 2-фосфата (50 мкг/мл), дексаметазона (39 нг/мл), Na пирувата (100 мкг/мл) и факторов роста TGF- $\beta$  (10 нг/мл) и IGF-I (100 нг/мл) (все «Sigma»). Полную замену среды для хондрогенной дифференцировки проводили каждые 3–4 дня на протяжении 10 суток, а затем на протяжении 12 суток использовали среду для стандартной остеогенной дифференцировки. Контролем культур служили клетки, которые культивировали в аналогичных условиях, однако без добавления компонентов для дифференцировки. Во время культивирования и направленного дифференцирования клетки находились в инкубаторе при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и увлажненной атмосфере.

Для цитохимического исследования остеогенной дифференцировки клеток по истечении срока дифференцирования культуры клеток фиксировали в 2%-м параформальдегиде. Для выявления депозитов кальция фиксированные монослои клеток окрашивали по методу von Kossa [4].

Проведенные исследования позволили получить следующие результаты. Из подкожной жировой ткани были получены адгезивные клетки фибробластоподобной морфологии с высокой пролиферативной активностью. Они экспрессировали CD44, CD90 на высоких уровнях (98 и 96% соответственно), для CD73 и CD34 уровень экспрессии был ниже (25 и 15% соответственно), а CD45 и CD117 экспрессировались на минимальных уровнях (3 и 3,5% соответственно) (рис. 1).

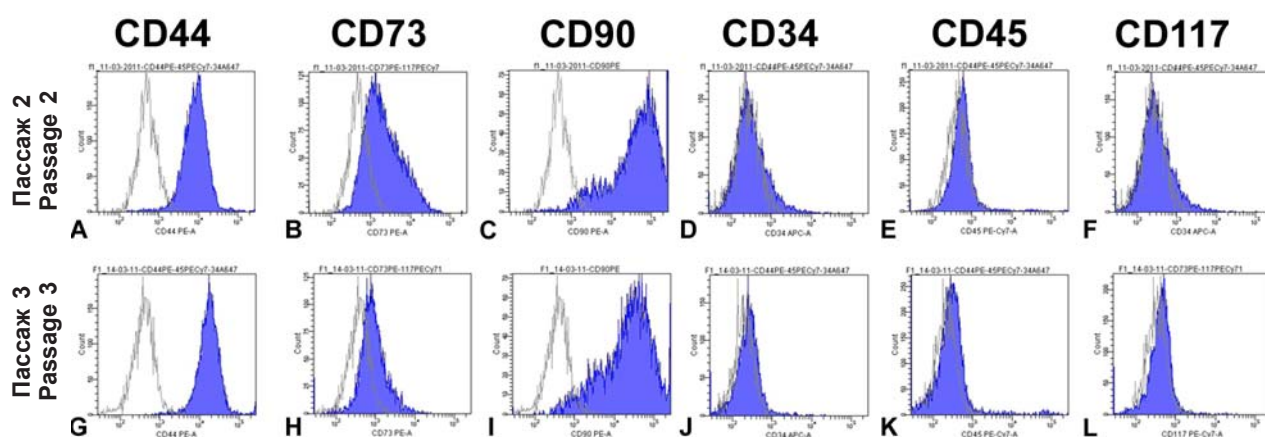
used during 12 days. The controls were the cells cultured in the same conditions but without the components for differentiation. During culturing and directed differentiation the cells were in incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and humid atmosphere.

To perform cytochemical analysis of cell osteogenic differentiation the cell cultures were fixed in 2% paraformaldehyde after termination of differentiation. To reveal the deposits of calcium the fixed cell monolayers were stained by von Kossa [4].

The performed investigations allowed to obtain the following results. Adhesive cells of fibroblast-like morphology with a high proliferative activity could be derived from subdermal adipose tissue. They expressed CD44, CD90 at high levels (98 and 96%, respectively), CD73 and CD34 expression level was lower (25 and 15%, respectively), and CD45 and CD117 were expressed at the minimal levels (3 and 3.5%, respectively) (Fig. 1).

After the change of culture medium for the medium for differentiation there was noted the change of cell morphology from spindle-like to polygonal one, and at the later terms of differentiation the cell boundaries could be hardly revealed. In the control cultures the cell morphology did not change significantly, but there was the increase of cell density that led to the exfoliation of monolayer in some wells.

Staining of cells according von Kossa did not revealed any stained elements in the experiment with standard method of differentiation (Fig. 2A), however in the wells with stepwise differentiation of cells we observed silver stained black calcium deposits (Fig. 2, B).



**Рис. 1.** Гистограммы иммунофенотипирования мультипотентных клеток жировой ткани мышей на 2-м (А–F) и 3-м (G–L) пассажах. Контурная линия – изотип-контроль, окрашенный график – уровень флуоресценции окрашенных антителами клеток.

**Fig. 1.** Histograms for immunophenotyping of mice adipose tissue multipotent cells at the 2<sup>nd</sup> (A–F) and the 3<sup>rd</sup> (G–L) passage. Contour line is an isotype-control, stained diagram is the fluorescence level of the cells stained with antibodies.

После замены культуральной среды на среду для дифференцировки было отмечено изменение морфологии клеток из веретеноподобной на полигональную, а на поздних сроках дифференцировки границы клеток было невозможно определить. В контрольных культурах морфология клеток значительно не изменялась, но отмечалось увеличение плотности клеток, что по истечении 15–21 дня приводило к отслаиванию монослоя в некоторых лунках.

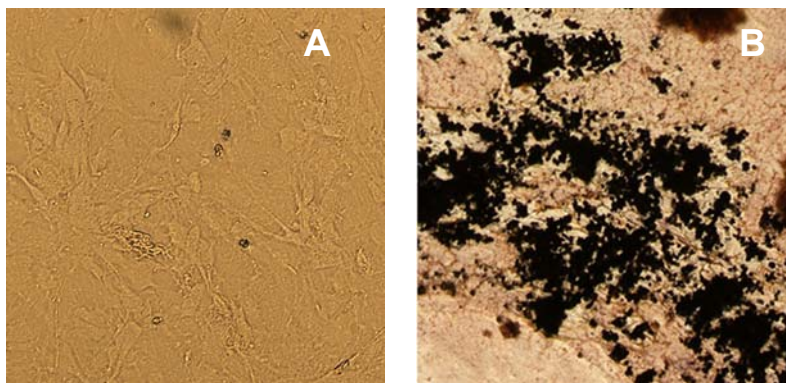
Окрашивание клеток по методу von Kossa не дало результатов в эксперименте с использованием стандартной методики дифференцирования (рис. 2, А), однако при поэтапной дифференцировке в лунках были отмечены депозиты кальция, окрашенные серебром в черный цвет (рис. 2, В).

Таким образом, нами были успешно выделены мультипотентные клетки из подкожной жировой ткани мышей, которые активно пролиферировали *in vitro* при стандартных условиях культивирования. Анализ поверхностных маркеров показал, что эти клетки экспрессируют стандартный для мультипотентных стволовых клеток набор антигенов. Дифференцировка МСК ЖТ в остеогенном направлении *in vitro* с применением стандартного протокола не дала положительных результатов, однако их предварительная хондрогенная индукция способствовала отложению клетками депозитов кальция во внеклеточном матриксе.

### Литература

1. Danisovic L, Lesny P., Havlas V. et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells // J. Appl. Biomed. – 2007. – Vol. 5. – P. 139–150.
2. Gao L., McBeath R., Chen C.S. Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin // Stem Cells. – 2010. – Vol. 28, №3. – P. 564–572.
3. Li J., Mareddy S., Tan D.M., Crawford R. et al. A minimal common osteochondrocytic differentiation medium for the osteogenic and chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells in the construction of osteochondral graft // Tissue Engineering. – 2009. – Vol. 15, №9. – P. 2481–2490.
4. Lillie R.D., Fuller H.M. Histopathologic technic and practical histochemistry.– New York: McGraw-Hill, 1976. – 1024 p.
5. Nakahara M., Takagi M., Hattori T. et al. Effect of subcultivation of human bone marrow mesenchymal stem on their capacities for chondrogenesis, supporting hematopoiesis, and telomea length // Cytotechnology. – 2005. – Vol. 47, №1–3. – P. 19–27.
6. Taniguchi N., Yoshida K., Ito T. et al. Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification // Mol. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 27, №16. – P. 5650–5663.

Поступила 01.06.2012



**Рис. 2.** Окрашивание МСК ЖТ, дифференцированных в остеогенном направлении *in vitro*, окрашивание по методу von Kossa,  $\times 100$ : А – с применением стандартного протокола дифференцировки; В – с применением предварительной хондроиндукции.

**Fig. 2.** Staining of AD MSCs differentiated in osteogenic lineage *in vitro* by von Kossa,  $\times 100$ : А – using standard protocol of differentiation; В – using preliminary chondroinduction.

Therefore we have successfully isolated multipotent cells from mice subcutaneous adipose tissue. The cells actively proliferated *in vitro* in standard culture conditions. Analysis of surface markers has shown that these cells expressed antigen set being standard for multipotent stem cells. *In vitro* differentiation of AD MSCs in osteogenic lineage under standard protocol yielded no results, however, their preliminary chondrogenic induction enabled cells to deposit calcium in extracellular matrix.

### References

1. Danisovic L, Lesny P., Havlas V. et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells // J. Appl. Biomed. – 2007. – Vol. 5. – P. 139–150.
2. Gao L., McBeath R., Chen C.S. Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin // Stem Cells. – 2010. – Vol. 28, N3. – P. 564–572.
3. Li J., Mareddy S., Tan D.M., Crawford R. et al. A minimal common osteochondrocytic differentiation medium for the osteogenic and chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells in the construction of osteochondral graft // Tissue Engineering. – 2009. – Vol. 15, N9. – P. 2481–2490.
4. Lillie R.D., Fuller H.M. Histopathologic technic and practical histochemistry.– New York: McGraw-Hill, 1976. – 1024 p.
5. Nakahara M., Takagi M., Hattori T. et al. Effect of subcultivation of human bone marrow mesenchymal stem on their capacities for chondrogenesis, supporting hematopoiesis, and telomea length // Cytotechnology. – 2005. – Vol. 47, N1–3. – P. 19–27.
6. Taniguchi N., Yoshida K., Ito T. et al. Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification // Mol. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 27, N16. – P. 5650–5663.

Accepted 01.06.2012