

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**  
**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**Кафедра молекулярной биологии**

**ФИЛАТОВА**  
Елена Анатольевна

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТЕОГЕННОГО  
ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ТКАНИ ПУПОВИНЫ В УСЛОВИЯХ  
КУЛЬТУРЫ**  
Дипломная работа

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

З.Б. Квачева

Допущена к защите

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Зав. кафедрой молекулярной биологии

доктор биологических наук, профессор А.Н. Евтушенков

Минск, 2017

## **РЕФЕРАТ**

Дипломная работа – 51 с., 15 рис., 4 табл., 63 источника

Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека (МСК ЖТ), мезенхимальные стволовые клетки ткани пуповины человека (МСК ТП), индуцированный остеогенез, индукторы остеогенной дифференцировки, культивирование клеток в условиях культуры.

Объекты исследования: культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и ткани пуповины человека.

Цель работы: сравнение остеогенного дифференцировочного потенциала МСК ЖТ и ТП (Вартонов студень) при культивировании их в индукционной среде.

Методы исследования: культуральный метод, проточная цитофлуориметрия, фазово-контрастная микроскопия, цитологический метод, ПЦР в реальном времени, методы биоинформатики.

Основными результатами выполненной работы являются:

- Приготовлены культуры МСК ЖТ и ТП человека, накоплена их биомасса в течение 3-х пассажей. На основании морфофункциональных и фенотипических свойств клеток подтверждена их принадлежность к МСК;
- Оптимизированы условия приготовления первичных культур МСК ТП человека: метод эксплантов оказался наиболее оптимальным по сравнению с ферментативной диссоциацией клеток;
- Проведена остеогенная дифференцировка МСК ЖТ и МСК ТП в условиях культуры с использованием скомпонованной индукционной среды, в состав которой входит BMP-2 в дозе 50 нг/мл, дексаметазон - 100 нМ, аскорбиновая кислота - 50 мкг/мл, β-глицерол-2-фосфат - 10 мМ;
- Индуцированная остеогенная дифференцировка в культурах МСК ЖТ и ТП подтверждена особенностями морфологии клеток и образованием оксификаторов кальция, выявляемых при окраске монослоя клеток ализариновым красным, а также уровнем экспрессии специфических генов: *щелочная фосфатаза (ALPL)*, *остеопонтин (SPPI)*, *остеокальцин (BGLAP)*. Выявлена большая степень выраженности специфических маркеров остеогенеза в культурах МСК ТП.

## РЭФЕРАТ

Дыпломная праца – 51 с., 15 мал., 4 табл., 63 крыніцы

Мезенхімальныя стваловыя клеткі тлушчавай тканіны чалавека (МСК ТТ), мезенхімальныя стваловыя клеткі тканіны пупавіны (МСК ТП), індукаваны астэагенез, індуктары астэагеннага дыферэнцыявання, культиваванне клетак ва ўмовах культуры.

Аб'екты даследавання: культуры мезенхімальных стваловых клетак тлушчавай тканіны і тканіны пупавіны чалавека.

Мэта працы: параўнанне астэагеннага дыферэнцыявальнага патэнцыялу МСК ТТ і МСК ТП (Вартанаў халадзец) пры культиваванні іх у індукцыйным асяроддзі.

Метады даследавання: культуральны метад, працёкавая цытрафлуарыметрыя, фазава-кантрасная мікраскапія, цыталагічны метад, ПЛР ў рэальным часе, метады біяінфарматыкі.

Асноўнымі вынікамі выкананай працы з'яўляюцца:

- Згатаваны культуры МСК ТТ і МСК ТП чалавека, назапашана біямаса на працягу 3-х пасажаў. На падставе морфа-функцыйных і фенатыпічных уласцівасцяў клетак пацверджана іх прыналежнасць;
- Аптымізаваны ўмовы гатавання першасных культур МСК ТП чалавека: метад эксплойтаў апынуўся найболей аптымальным у параўнанні з ферментацыйнай дысацыяцый клетак;
- Праведзена астэагеннае дыферэнцыяванне МСК ТТ і МСК ТП ва ўмовах культуры з выкарыстаннем скампанаванага індукцыйнага асяроддзя, у склад якой уваходзіць BMP-2 у дозе 50 нг/мл, дексаметазон- 100 нМ, аскарбінавая кіслата - 50 мкг/мл, β-гліцэрол-2-фосфат - 10 мМ;
- Індукаванае астэагеннае дыферэнцыяванне ў культурах МСК ТТ і МСК ТП пацверджана асаблівасцямі марфалогіі клетак і адукцыяй аксіфікатаў кальцу, якія выяўляюцца пры афарбоўцы монапласта клетак алізарынавым чырвоным, а таксама ўзорунем экспрэсіі спецыфічных генаў: *ицолачная фасфатаза (ALPL)*, *астэапантын (SPP1)*, *астэакальцын (BGLAP)*. Выяўлена большая ступень выяўленасці спецыфічных маркераў астэагенезу ў культурах МСК ТТ і МСК ТП.

## ABSTRACT

Diploma work - 51 p., 15 Fig., 4 Tables, 63 references

Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs), human umbilical cord-derived tissue mesenchymal stem cells (UC-MSCs), induced osteogenesis, inducers of osteogenic differentiation, cell cultivation under culture conditions.

Research objects were cultures of human adipose tissue-derived and umbilical cord-derived tissue mesenchymal stem cells.

The purpose of this work was to compare osteogenic differentiation potential of AT-MSCs and UC-MSCs (Wharton's jelly) when cultivating in an induction medium.

Work was carried out using cultural method, flow cytometry, phase contrast microscopy, citologic method, real-time PCR, bioinformatic methods.

The main results of the carried out work are:

- Human AT-MSCs and UC-MSCs cultures were prepared, their biomass was accumulated during 3 passages. Their belonging to the MSC was confirmed on the basis of their morphofunctional and phenotypic properties;
- The preparation of primary UC-MSCs culture conditions were optimised: the tissue explants method was the most optimal as compared with collagenase-based enzymatic tissue digestion;
- Osteogenic differentiation of AT-MSCs and UC-MSCs under culture conditions was carried out using composed induce medium which consisted of BMP-2 - 50 ng/ml, dexamethasone - 100 nM, ascorbic acid - 50 microg/ml,  $\beta$ -glycerol-2-phosphate - 10 mM;
- Induced osteogenic differentiation of AT-MSCs and UC-MSCs under culture conditions was confirmed by alizarin red staining mineralized bone nodules and specific gene expression level: *alkaline phosphatase (ALPL)*, *osteopontin (SPP1)*, *osteocalcin (BGLAP)*. UC-MSCs cultures have higher specific gene expression level of osteogenesis.