

УДК 615.27

ВЛИЯНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ В ОСТЕОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Н.А. Надеждина, Ю.И. Тарануха, М.В. Покровский, С.В. Надеждин

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Введение

Рекомбинантный эритропоэтин (рЭПО) широко используется в клинической практике, однако лечение рЭПО инициирует дополнительные нежелательные эффекты, которые включают снижение костной массы, что повышает риск переломов у людей с высокими уровнями эритропоэтина [1]. Сегодня уже установлено, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) обеспечивают регенерацию костной ткани посредством дифференцировки в остеобласты [2, 3], при этом влияние рекомбинантного эритропоэтина на МСК изучено недостаточно.

Цель работы – провести оценку воздействия различных концентраций субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека на пролиферацию и дифференцировку в остеогенном направлении мезенхимных стволовых клеток человека.

Материалы и методы

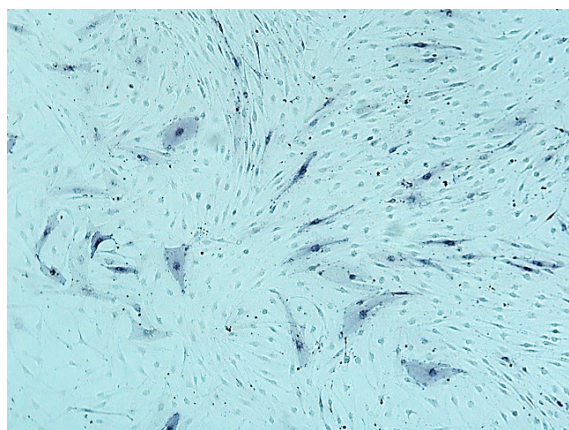
В работе использовали мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека выделенные из жировой ткани (ООО «БиолоТ», РФ), которые культивировали в питательной среде DMEM/F12 (ООО «БиолоТ», РФ) с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой, глутамином и антибиотиками в CO₂ инкубаторе при 37 °C, 5 % CO₂. МСК в количестве 0,02x10⁶ вносили в лунки 96 луночных планшетов, в которые добавляли рекомбинантный эритропоэтин человека в разведении 1:100, 1:1000, 1:10000 и 1:100000. В качестве исходного раствора использовали 1 мл рЭПО (Кат. №: PSG110–10, производитель клеточная линия СНО, молекулярный вес: Около 33 кДа, ООО «СайСторЛаб», РФ). Контролем явилась питательная среда DMEM/F12 (ООО «ПанЭко», РФ) с 10 % ЭТС, 2 mM глутамин и антибиотиками (пенициллин / стрептомицин 100 мкг/мл). Индекс пролиферативной активности (ПАинд., в %) МСК оценивали на 3 день с использованием реагента MTT (Sigma-Aldrich, США) по формуле: ПАинд. = ОП_о/ОП_к x100 %, где ОП – оптическая плотность; э – опытная группа; к – контрольная группа. Способность дифференцировки МСК в остеогенном направлении оценивали на 7 день культивирования по экспрессии щелочной фосфатазы при помощи реагента BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich, США) на фотометре (Multiskan FC, Thermo Scientific, США). Индекс остеиндуктивной активности (ОСТинд., в %) рассчитывали по формуле: ОСТинд. = ОП_о/ОП_к x100 %, где ОП – оптическая плотность; о – опытная группа; к – контрольная группа.

Полученные результаты обрабатывали с помощью ПО Statistica 10.0, нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием w-критерия Шапиро-Уилкса. Значимость межгрупповых различий оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) при p<0.05,

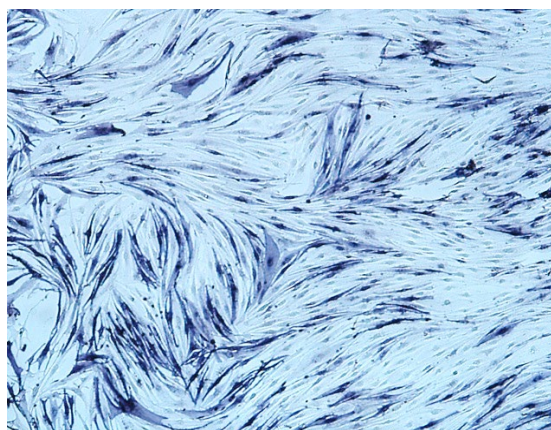
Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что увеличение пролиферативной активности МСК отмечается при разведении 1:10000 (ПАинд. составил 117,89 %), различия по сравнению с контролем достоверны при p ≤ 0,05. Необходимо отметить, что при разведении 1:100 (ПАинд. составил 101,81 %), нет увеличения пролиферативной активности МСК, различия по сравнению с группой контроля не достоверны. Снижение пролиферативной активности МСК установлено в разведении 1:100000 (ПАинд. составил 106,61 %), различия по сравнению с контролем достоверны при p ≤ 0,05.

Активация дифференцировки МСК в остеогенном направлении установлена, начиная с разведения 1:100 (ОСТинд. составил 112,51 %) и 1:1000 (ОСТинд. составил 128,87 %), различия по сравнению с контролем достоверны при p ≤ 0,05 (рис. 1.). при этом экспрессия щелочной фосфатазы была наибольшей в разведении 1:1000. Снижение экспрессии щелочной фосфатазы установлено в разведении 1:10000 (ОСТинд. составил 118,14 %), различия по сравнению с контролем достоверны при p ≤ 0,05.



(a)



(б)

Рис. 1. Экспрессия щелочной фосфатазы в МСК у контрольной (А) и опытной групп (Б) при разведении 1:1000. Ув. х 100

Заключение

Рекомбинантный эритропоэтин в меньших разведениях не повышает пролиферативную активность МСК, наибольшая пролиферативная активность МСК установлена в разведении 1:10000, при этом снижение пролиферативной активности выявлено в разведении 1:100000. Активация дифференцировки МСК в остеогенном направлении напротив, увеличивается в меньших разведениях. Наибольшая экспрессия щелочной фосфатазы выявлена в разведении 1:1000, тогда как в разведении 1:10000 отмечается снижение экспрессии щелочной фосфатазы МСК.

Таким образом, субстанция рекомбинантного эритропоэтина человека оказывает существенное воздействие на пролиферацию и дифференцировку в остеогенном направлении МСК, что необходимо учитывать при дозировании лекарственного препарата, где рЭПО основное действующее вещество.

Литература

1. Kristjansdottir HL, Lewerin C, Lerner UH, et al. // J Bone Miner Res. 2020. V. 35(2). P. 298–305. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3900>
2. Infante A., Rodríguez C.I. Stem Cell Res Ther. 2018; 9: 244. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0995-x>
3. Sun Y., Wan B., Wang R., Zhang B., Luo P., Wang D., Nie J-J., Chen D., Wu X. Front. Cell Dev. Biol. 2022. 10:808303. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.808303>