



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21), (22) Заявка: 2007143233/15, 21.11.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
21.11.2007

(43) Дата публикации заявки: 27.05.2009

(45) Опубликовано: 20.10.2009 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: GREGORY C.A at al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Analytical Biochemistry. - 2004. - Vol.329. - N1. - P.77-84. WANG YH at al. Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. Biotechnol Prog. 2006 (см. прод.)

Адрес для переписки:

630099, г.Новосибирск, ул. Ядринцовская, 14,  
ГУ НИИКИ СО РАМН

(72) Автор(ы):

Останин Александр Анатольевич (RU),  
Петровский Ярослав Леонидович (RU),  
Шевела Екатерина Яковлевна (RU),  
Курганова Екатерина Владимировна (RU),  
Черных Елена Рэмовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное учреждение  
научно-исследовательский институт  
клинической иммунологии СО РАМН (RU)

**(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ОСТЕОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и клеточной биологии, а именно к трансплантологии, травматологии и ортопедии. Предложен способ оценки остеогенного потенциала мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Способ основан на измерении оптической плотности культур МСК в диапазоне 2-кратно возрастающих клеточных концентраций, после их культивирования в остеогенной индукционной

среде и окрашивания депозитов кальция нитратом серебра. Способ позволяет определять наиболее оптимальные условия функционирования МСК в зависимости от типа тканевого источника МСК, клеточной плотности МСК, кратности/длительности пассирования МСК in vitro, концентрации ростовых сывороточных факторов в микроокружении, характера сопутствующей патологии. 3 з.п. ф-лы, 5 табл.

(56) (продолжение):

Nov-Dec; 22(6): 1697-701. LEE WY at al. The effect of bone marrow transplantation on the osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Jan; 87(1):329-35.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007143233/15, 21.11.2007**

(24) Effective date for property rights:  
**21.11.2007**

(43) Application published: **27.05.2009**

(45) Date of publication: **20.10.2009 Bull. 29**

Mail address:  
**630099, g.Novosibirsk, ul. Jadrintsovskaja, 14,  
GU NIIKI SO RAMN**

(72) Inventor(s):  
**Ostanin Aleksandr Anatol'evich (RU),  
Petrovskij Jaroslav Leonidovich (RU),  
Shevela Ekaterina Jakovlevna (RU),  
Kurganova Ekaterina Vladimirovna (RU),  
Chernykh Elena Rehmovna (RU)**

(73) Proprietor(s):  
**Gosudarstvennoe uchrezhdenie nauchno-  
issledovatel'skij institut klinicheskij  
immunologii SO RAMN (RU)**

**(54) METHOD OF OSTEOGENIC POTENTIAL ASSESSMENT FOR MESENCHYMAL STROMAL CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.  
SUBSTANCE: invention claims method of osteogenic potential assessment for mesenchymal stromal cells (MSC). Method is based on optic density measurement of MSC cultures within twice increasing cell concentration range, further cell cultivation in osteogenic induction medium and

calcium deposit colouring by silver nitrate.

EFFECT: defining optimal conditions of MSC function depending on tissue source type of MSC, MSC cell density, multiplication factor, MSC subculture duration in vitro, serum growth factor concentration in microenvironment, concomitant pathology character.

4 ex, 5 tbl, 4 cl

RU 2 370 771 C2

RU 2 370 771 C2

Изобретение относится к медицине и клеточной биологии и может быть использовано в трансплантологии, травматологии и ортопедии для предварительной оценки *in vitro* функциональной активности мезенхимальных стромальных клеток с целью определения их остеогенного потенциала.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) относятся к классу соматических полипотентных клеток-предшественников, которые характеризуются способностью к самоподдержанию и дифференцировке в различные типы клеток мезодермы (остеобласты, хондроциты, адипоциты). Впервые МСК были обнаружены в костном мозге, однако, в настоящее время показано, что МСК могут быть выделены также из других источников (жировая ткань, плацента, пуповинная кровь, амниотическая жидкость, хрящевая и мышечная ткань). В 2006 году Комитетом по стволовым клеткам Международного общества клеточной терапии была проведена согласительная конференция и определены «минимальные» критерии, специфичные для МСК: а) адгезия к пластику и фибробластоподобная морфология, б) характерный иммунофенотип (экспрессия CD73, CD90, CD105 и отсутствие экспрессии CD34, CD45, HLA-DR) и в) способность дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении [1].

В современной трансплантологии широко разрабатываются новые подходы по использованию МСК, например, для восстановления репаративного остеогенеза у пациентов с различными его нарушениями как местного, так и системного характера [2, 3]. При этом наиболее безопасным считается использование аутологичного клеточного материала, что позволяет отказаться от гетеро- или аллотрансплантаций, сопряженных с решением проблем гистосовместимости, этических и юридических вопросов, а также позволяет исключить риск ятрогенного инфицирования.

Однако использование МСК в целях аутотрансплантации диктует необходимость предварительной оценки их дифференцировочного потенциала. Способность МСК к направленной дифференцировке *in vitro* является ключевым параметром, отражающим функциональную активность МСК. Очевидно, что эффективность лечения с использованием трансплантации МСК во многом будет определяться сохранностью их дифференцировочных потенциалов, которые, в свою очередь, прямо зависят от множества факторов (возраст и генетические особенности больного, характер/распространенность патологического процесса, медикаментозная предлеченность, источник получения и особенности выделения/экспансии МСК *in vitro* и т.д.).

Дифференцировку МСК в остеогенном направлении стимулируют путем их культивирования в течение 18-21 сут в индукционной питательной среде, содержащей дексаметазон или 1,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub>, β-глицерофосфат и аскорбиновой кислоты-2-фосфат. Для оценки остеогенной дифференцировки МСК используют несколько подходов [4, 5]. Чаще всего проводят гистохимический анализ клеточного монослоя по окрашиванию депозитов кальция во внеклеточном матриксе с помощью специальных красителей (либо ализарина красного S, либо нитрата серебра методом von Kossa). Наличие минерализации, как результат остеогенной дифференцировки МСК, оценивается визуально с помощью обычной световой микроскопии. Реже используют проточную цитофлюориметрию или полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (real-time PCR) для оценки экспрессии поверхностных маркеров или мРНК генов, специфичных для остеобластов [6, 7]. Данные подходы являются, по сути, качественными методами, которые позволяют

только выявить остеогенную дифференцировку МСК (есть/нет) без учета ее выраженности и интенсивности.

Для количественной оценки остеогенного потенциала МСК используют измерение уровня кальция в супернатантах, полученных из лизатов клеток монослоя и 5 внеклеточного матрикса. Данный метод требует этапа экстракции синтезированного кальция, для чего МСК обрабатывают 0,5 М раствором HCl при 4°C в течение 4 ч, затем полученный супернатант ультрацентрифугируют, добавляют коммерческий детектирующий реагент и измеряют концентрацию кальция (Ca<sup>2+</sup>, мМ/мкг белка) с 10 помощью фотометрии при длине волны 598 нм. Аналогичный подход по оценке остеогенного потенциала МСК основан на измерении активности щелочной фосфатазы (ЩФ). В этом случае лизат клеток монослоя получают с помощью раствора 0,01% NaCl и 0,1% Triton X-100, полученный супернатант инкубируют с 15 раствором р-нитрофенил фосфата при 37°C, затем ферментативную реакцию останавливают добавлением 1 М раствора NaOH. Уровень активности ЩФ (нМ/мин/мкг белка) также определяют с помощью многоканальной фотометрии при 20 длине волны 415 нм и температуре 37°C, используя стандартную калибровочную кривую разведений р-нитрофенола.

Существенным недостатком данных методов является относительная сложность их выполнения, связанная с необходимостью 1) этапа экстракции для получения клеточного лизата, 2) дополнительной реагентки для постановки самого теста и создания калибровочных кривых, 3) стандартизации полученных результатов по 25 белку. Перечисленные недостатки не только технически усложняют, но и существенно повышают время и стоимость лабораторного анализа.

Наиболее близким решением, избранным в качестве прототипа, является способ оценки остеогенного потенциала МСК, основанный на измерении оптической плотности красителя (ализарина красного S), используемого для окрашивания 30 депозитов кальция, содержащихся во внеклеточном матриксе МСК после их культивирования в остеогенной индукционной среде [8]. В соответствии с предложенным способом МСК, после их остеогенной дифференцировки, окрашивают стандартно с использованием ализарина красного S, после чего краситель экстрагируют из клеточного монослоя и внеклеточного матрикса с помощью 35 уксусной кислоты, затем полученный супернатант нейтрализуют раствором хлорида аммония. Интенсивность цветовой реакции красителя, которая пропорциональна количеству образовавшихся депозитов кальция, оценивают фотометрически при длине волны 405 нм. Тем не менее, для осуществления данного способа также необходим 40 этап экстракции красителя с использованием дополнительной реагентки, а также создание специальных условий (низкая рН) для повышения чувствительности метода.

Задачей изобретения является создание способа полуколичественной оценки остеогенного потенциала мезенхимальных стромальных клеток, позволяющего по 45 величине рассчитанных индексов определять наиболее оптимальные условия функционирования МСК в зависимости от типа тканевого источника МСК, клеточной плотности МСК, кратности/длительности пассирования МСК *in vitro*, концентрации ростовых сывороточных факторов в микроокружении и т.д., с целью повышения эффективности их последующей трансплантации в области травматологии и 50 ортопедии.

Задача решается тем, что в предложенном способе оценка остеогенного потенциала МСК достигается измерением оптической плотности красителя в цельных культурах МСК в диапазоне клеточных концентраций от 625 до 10000 клеток/лунку и

последующим определением индекса остеогенной дифференцировки в виде соотношения О/К, где О - оптическая плотность в опытных образцах МСК и К - в контрольных образцах МСК, культивированных в таком же диапазоне клеточных концентраций без добавления индукторов остеогенной дифференцировки.

5 Предложенный способ позволяет оценивать эффективность остеогенной дифференцировки МСК *in vitro* и может быть использован для анализа функциональной активности МСК, выделенных из различных тканевых источников, а также для характеристики МСК в процессе их культивирования *in vitro* или при  
10 различных патологических состояниях. Кроме того, предложенный способ по сравнению с прототипом значительно упрощает технологию оценки остеогенного потенциала МСК и позволяет сократить материальные затраты и время, необходимые для проведения анализа.

Способ осуществляется следующим образом.

15 В качестве исходного материала для получения МСК используют костный мозг, жировую или плацентарную ткань. Костный мозг получают аспирационным путем из крыла подвздошной кости. По стандартной методике аспирируют от 5 до 100 мл костного мозга, помещают полученный аспират в стерильный флакон с раствором гепарина из расчета 50 Ед/мл и инкубируют при 37°C в течение 40 мин. После  
20 гравитационного разделения цельного костного мозга в отдельный флакон собирается «верхняя» фракция, состоящая из клеток лейкоцитарной аутоплазмы. После центрифугирования (1500 об/мин, 8 мин) осадок клеток лейкоцитарной аутоплазмы ресуспендируют в фосфат-забуференном физиологическом растворе (ЗФР). Затем клетки лейкоцитарной аутоплазмы  
25 наслаивают на градиент плотности фиколла-верографина (1,078 г/л) и центрифугируют в течение 20 мин при 3000 об/мин. Собранные из интерфазы костномозговые мононуклеарные клетки (МНК-км) трехкратно отмывают в ЗФР и ресуспендируют в среде  $\alpha$ -МЕМ («БиолоТ», С-Пб). Подсчитывают общее количество  
30 выделенных МНК-км и определяют их жизнеспособность по окраске трипановым синим.

Липоаспират, полученный при проведении липосакции, подвергают ферментативно-механической диссоциации с 0,1% раствором коллагеназы. Ткань плаценты, полученной при срочных физиологических родах, также подвергают  
35 механической и ферментативной диссоциации раствором трипсина, ЭДТА и коллагеназы. Подсчитывают общее количество ядросодержащих клеток, выделенных из жировой или плацентарной ткани (ЯСК-жт и ЯСК-пт), определяют их жизнеспособность по окраске трипановым синим.

40 Для получения обогащенной популяции МСК выделенные МНК-км, ЯСК-жт или ЯСК-пт культивируют с исходной плотностью  $1 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup> в пластиковых флаконах (Nunc, площадью 75 см<sup>2</sup>) в среде  $\alpha$ -МЕМ, содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки, при 37°C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Через 24 ч инкубации  
45 культуральную среду обновляют и удаляют фракцию неприлипающих к пластику клеток.

С целью количественной экспансии МСК фракцию прилипающих к пластику клеток продолжают культивировать до получения клеточного монослоя, занимающего 80-90% площади культурального флакона (в среднем в течение 14 сут с  
50 заменой культуральной среды каждые 4-5 сут). Затем обогащенную популяцию МСК получают с помощью стандартной методики отделения клеток от пластиковой поверхности в присутствии 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора ЭДТА, при 37°C, в течение 8-10 мин, подсчитывают общее количество выделенных МСК и их

жизнеспособность.

С целью оценки остеогенного потенциала МСК полученные клетки помещают в лунки 96-луночных плоскодонных планшетов в диапазоне 2-кратно возрастающих концентраций от 625 до 10000 клеток/лунку в среде  $\alpha$ -МЕМ, дополненной 100 мкг/мл гентамицина и 20% эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», С-Пб.). Через 72 ч проводят полную замену культуральной среды: в опытных образцах среду  $\alpha$ -МЕМ дополняют индукторами остеогенной дифференцировки МСК (10 ммоль/л  $\beta$ -глицерофосфата, 100 нмоль/л дексаметазона и 0,2 ммоль/л аскорбата-дифосфата), тогда как в контрольных образцах МСК продолжают культивировать в стандартных условиях. Замену соответствующих сред (стандартной и индукционной) проводят дважды в неделю. Через 18 дней оценивают эффективность остеогенной дифференцировки МСК по методу von Kossa. Для этого опытные и контрольные культуры МСК фиксируют в 10% растворе формальдегида в течение 10-20 минут, затем обрабатывают 1% раствором нитрата серебра в течение 20 минут под ультрафиолетовым облучением, после чего двукратно промывают дистиллированной водой и выдерживают в 5% растворе тиосульфата натрия для удаления неспецифических избытков серебра. Свидетельством остеогенной дифференцировки МСК является продукция кальция в виде депозитов внеклеточного матрикса, которые окрашиваются нитратом серебра в черный цвет. Интенсивность цветовой реакции оценивают на многоканальном фотометре Multiskan Ascent (Thermo Electron Corp.) при длине волны 492 нм. Полученные результаты оптической плотности (в единицах экстинкции) в опытных и контрольных образцах выражают в виде Индекса Остеогенной Дифференцировки (ИОД), который рассчитывают по формуле:  $ИОД=O/K$ , где O - оптическая плотность в опытных и K - в контрольных образцах.

Примеры конкретного выполнения.

Пример №1. Использование предложенного способа оценки остеогенного потенциала МСК показывает, что МСК, выделенные из жировой ткани, дифференцируются в остеогенном направлении, при этом пик продукции депозитов кальция регистрируется в культурах, содержащих 5000-10000 клеток/лунку.

|                         |          | Количество МСК/лунку |                 |                 |                 |                 |
|-------------------------|----------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                         |          | 625                  | 1250            | 2500            | 5000            | 10 000          |
| МСК жировой ткани (n=6) | Контроль | 0,118                | 0,117           | 0,102           | 0,098           | 0,091           |
|                         | Опыт     | 0,127                | 0,127           | 0,162           | 0,179           | 0,149           |
|                         | иод      | 0,97                 | 1,09            | 1,01            | 1,51            | 1,57            |
|                         |          | 0,91 $\pm$ 0,07      | 1,05 $\pm$ 0,06 | 1,15 $\pm$ 0,15 | 1,68 $\pm$ 0,37 | 1,61 $\pm$ 0,14 |

Примечание: данные представлены в виде Median и M $\pm$ SE

Из данных таблицы 1 видно, что в контрольных культурах в зависимости от исходной концентрации клеток оптическая плотность составляет в среднем 0,100 ед. экст., что, очевидно, связано с образованием плотного монослоя клеток на поверхности лунки в процессе длительного культивирования. Наличие в культуральной среде факторов, индуцирующих остеогенную дифференцировку МСК, проявляется увеличением оптической плотности в опытных образцах за счет образовавшихся депозитов кальция, окрашенных в черный свет. Пик увеличения оптической плотности, в среднем на 51-57%, приходится на культуры с исходным содержанием МСК 5000-10000 кл/лунку.

Пример №2. Использование предложенного способа оценки остеогенного

потенциала МСК показывает, что МСК, выделенные из плацентарной ткани, также способны в заданных культуральных условиях к дифференцировке в остеогенном направлении. При этом, однако, обнаруживаются отличительные особенности продукции депозитов кальция. Из данных таблицы 2 видно, что в отличие от МСК жировой ткани пик увеличения оптической плотности регистрируется при исходной концентрации МСК плаценты 2500/лунку, который затем постепенно снижается в культурах с более высоким количеством МСК (5000/лунку), достигая базального уровня в лунках, содержащих 10000 клеток. Но даже при оптимальной клеточной концентрации остеогенный потенциал плацентарных МСК ниже, чем жировых МСК (ИОД 1,39-1,23 против 1,51-1,57, соответственно).

|                        |          | Количество МСК/лунку |           |           |          |           |
|------------------------|----------|----------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
|                        |          | 625                  | 1250      | 2500      | 5000     | 10 000    |
| МСК<br>плацентры (n=4) | Контроль | 0,101                | 0,124     | 0,111     | 0,113    | 0,129     |
|                        | Опыт     | 0,076                | 0,117     | 0,139     | 0,150    | 0,111     |
|                        | иод      | 0,74                 | 1,17      | 1,39      | 1,23     | 1,08      |
|                        |          | 0,80±0,18            | 1,18±0,16 | 1,38±0,18 | 1,28±0,9 | 0,97±0,16 |

Примечание: данные представлены в виде Median и M±SE

Пример №3. Использование предложенного способа оценки остеогенного потенциала МСК показывает, что изменение условий культивирования или свойств самих МСК сопровождается изменением их дифференцировочного остеогенного потенциала. В таблице 3 представлены данные сравнительного анализа интенсивности продукции депозитов кальция МСК жировой ткани, различающихся по продолжительности предварительного культивирования.

|                                 |      | Количество МСК/лунку |           |           |           |           |
|---------------------------------|------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                 |      | 625                  | 1250      | 2500      | 5000      | 10 000    |
| МСК (n=6) после 1<br>2 пассажей | Опыт | 0,127                | 0,127     | 0,162     | 0,179     | 0,149     |
|                                 | ИОД  | 0,97                 | 1,09      | 1,01      | 1,51      | 1,57      |
|                                 |      | 0,91±0,07            | 1,05±0,06 | 1,15±0,15 | 1,68±0,37 | 1,61±0,14 |
| МСК (n=1) после 9<br>пассажей   | Опыт | 0,081                | 0,086     | 0,085     | 0,088     | 0,104     |
|                                 | ИОД  | 1,17                 | 1,11      | 1,0       | 1,05      | 1,17      |

Примечание: данные представлены в виде Median и M±SE

Видно, что в отличие от клеток, которые до начала остеогенной дифференцировки культивировались в среднем 20 суток (1-2 пассажа), МСК, полученные после 9 пассажей (120 суток культивирования), были резистентны к остеогенным сигналам и не продуцировали депозиты кальция, что, очевидно, связано, с известным феноменом «клеточного старения».

Из данных таблицы 4 видно, что в условиях снижения процентного содержания эмбриональной телячьей сыворотки (FCS) в культуральной среде (с 20 до 10 и 5%) способность МСК к дифференцировке в остеогенном направлении существенно изменяется.

|   |                         | Количество МСК/лунку |      |      |        |      |
|---|-------------------------|----------------------|------|------|--------|------|
|   |                         | 1250                 | 2500 | 5000 | 10 000 |      |
| 5 | МСК жировой ткани (n=1) | FCS 20%              | 0,78 | 1,04 | 1,53   | 2,18 |
|   |                         | FCS10%               | 0,91 | 1,10 | 1,74   | 2,31 |
|   |                         | FCS 5%               | 0,91 | 1,13 | 2,28   | 3,20 |
|   | МСК плаценты (n=1)      | FCS 20%              | 1,50 | 1,53 | 1,52   | 0,52 |
|   |                         | FCS10%               | 1,07 | 1,13 | 1,10   | 1,12 |
|   |                         | FCS 5%               | 0,90 | 0,96 | 1,09   | 1,04 |

10 При этом также обнаруживаются специфические особенности МСК различного тканевого происхождения. МСК, выделенные из жировой ткани, характеризовались обратной зависимостью уровня продукции депозитов кальция от содержания FCS в культуральной среде, т.е. максимальная интенсивность их остеогенной дифференцировки наблюдалась при самой низкой 5% концентрации эмбриональной сыворотки. Наоборот, для плацентарных МСК была характерна прямая зависимость эффективности их остеогенной дифференцировки от содержания сывороточных факторов в культуральной среде.

20 Пример №4. Использование предложенного способа оценки остеогенного потенциала МСК показывает, что МСК, выделенные из костного мозга больных с различными заболеваниями, отличаются по своей функциональной активности и способности дифференцироваться в остеогенном направлении.

25 В таблице 5 представлены значения индексов остеогенной дифференцировки МСК, выделенных из аспирата костного мозга больных со спинальной травмой (СпТр): 3 пациентов в возрасте 38-40 лет и 2 детей в возрасте 4 и 9 лет; больных циррозом печени (ЦП, n=4, 36-48 лет), острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ, n=1, 31 год) и системной красной волчанкой (СКВ, n=1,41 год).

30 Таблица 5  
Остеогенный дифференцировочный потенциал МСК, выделенных из костного мозга больных различными заболеваниями

|                      |     | Количество МСК/лунку |           |           |           |           |
|----------------------|-----|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                      |     | 625                  | 1250      | 2500      | 5000      | 10 000    |
| СпТр (n=3, взрослые) | иод | 0,90                 | 0,88      | 0,94      | 1,01      | 1,26      |
|                      |     | 0,77±0,19            | 0,76±0,22 | 0,93±0,09 | 1,18±0,42 | 1,72±0,56 |
| СпТр (n=2, дети)     | иод | 1,27                 | 1,64      | 1,32      | 1,04      | 1,08      |
|                      |     | 1,27±0,13            | 1,64±0,01 | 1,32±0,15 | 1,04±0,08 | 1,08±0,10 |
| ЦП (n=4)             | иод | 1,14                 | 1,38      | 1,38      | 1,27      | 2,05      |
|                      |     | 1,25±0,15            | 1,32±0,19 | 1,46±0,13 | 1,42±0,28 | 1,77±0,38 |
| ОЛЛ (n=1)            | иод | 0,96                 | 1,08      | 0,97      | 0,98      | 0,90      |
| СКВ (n=1)            | иод | 1,1                  | 0,97      | 0,98      | 1,04      | 1,18      |

40 Примечание: данные представлены в виде Median и M±SE

45 Таким образом, предлагаемый способ измерения при длине волны 492 нм оптической плотности цельных культур МСК в диапазоне клеточных концентраций от 625 до 10000 клеток/лунку, после их культивирования в остеогенной индукционной среде и окрашивания депозитов кальция нитратом серебра, позволяет проводить полуквантитативную оценку эффективности остеогенной дифференцировки МСК in vitro. Предлагаемый способ может быть использован для повышения эффективности трансплантации МСК в области травматологии и ортопедии, поскольку позволяет определять наиболее оптимальные условия функционирования МСК в зависимости от типа тканевого источника МСК, клеточной плотности МСК, кратности/длительности пассирования МСК in vitro, концентрации ростовых сывороточных факторов в микроокружении, характера сопутствующей патологии. Дополнительным



преимуществом предлагаемого способа является отсутствие необходимости в проведении этапа экстракции красителя из монослоя клеток и внеклеточного матрикса, что позволяет без снижения качества анализа упростить технологию его проведения за счет сокращения материальных и временных затрат.

#### Литература

1. Dominici M., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. // *Cytotherapy*. - 2006. - Vol.8, №4. - P.315-317.
2. Чайлахян Р.К. Способ восстановления целостности костей и трансплантат для его осуществления. // Патент РФ №2167662 от 27.05.2001 г.
3. Гольдштейн Д.В., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х. и др. Биотрансплантат и способ лечения остеопороза // Патент РФ №2235442 от 14.05.2004 г.
4. Jaiswal N., et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro // *J Cell Biochem*. - 1997. - Vol.64. - P.295-312.
5. Ogura N., et al. Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin // *J Oral Science*. - 2004. - Vol.46, N4. - P.207-213.
6. D'Ippolito G, et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential // *J Cell Sci*. - 2004. - Vol.117. - P.2971-2981.
7. Gronthos S., et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow // *J Cell Sci*. - 2003. - Vol.116. - P.1827-1835.
8. Gregory C.A., Gunn W.G., Peister A., Prockop D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction // *Analytical Biochemistry*. - 2004. - Vol.329. - N1. - P.77-84.

#### Формула изобретения

1. Способ оценки остеогенного потенциала мезенхимальных стромальных клеток, включающий фотометрическое измерение оптической плотности красителя, используемого для окрашивания депозитов кальция, содержащихся во внеклеточном матриксе МСК после их культивирования в остеогенной индукционной среде, отличающийся тем, что оптическую плотность красителя измеряют в цельных культурах МСК в заданном диапазоне 2-хкратно возрастающих клеточных концентраций, в качестве красителя используют нитрат серебра, при этом интенсивность цветовой реакции оценивают на многоканальном фотометре при длине волны 492 нм, и затем рассчитывают индекс остеогенной дифференцировки в виде соотношения  $O/K$ , где  $O$  - оптическая плотность в опытных образцах МСК и  $K$  - в контрольных образцах МСК, культивированных в таком же диапазоне клеточных концентраций без добавления индукторов остеогенной дифференцировки.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве культур МСК могут быть использованы клетки, выделенные из различных тканевых источников, например, из костного мозга, жировой, плацентарной ткани.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве культур МСК могут быть использованы клетки, выделенные из костного мозга больных с различными патологическими состояниями.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве культур МСК могут быть использованы клетки, полученные при различных условиях культивирования *in vitro*.