

# Иммунофенотипические различия и остеобластная дифференцировка стволовых клеток жировой ткани

DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2023.02.0001

© Е.Г. Учасова, Ю.А. Дылева, Е.В. Белик, О.В. Груздева.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово

*Для цитирования: Е.Г. Учасова, Ю.А. Дылева, Е.В. Белик, О.В. Груздева, Евгения Геннадьевна Учасова – ORCID 0000-0003-432; Юлия Александровна Дылева – ORCID 0000-0002-6890-3287; Екатерина Владимировна Белик – ORCID 0000-0003-3996-3325; Ольга Викторовна Груздева – 0000-0002-7780-829X. Иммунофенотипические различия и остеобластная дифференцировка стволовых клеток жировой ткани. Атеросклероз и дислипидемии. 2023;2(51):7-17. DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2023.02.0001*

## Абстракт

Благодаря набору уникальных свойств, например способности дифференцироваться в различные типы клеток соединительной ткани, мезенхимальные стволовые клетки привлекают все большее внимание исследователей. До настоящего времени большое число работ было посвящено изучению мезенхимальных клеток костного мозга. Однако не так давно в стромально-васкулярной фракции жировой ткани также обнаружили стволовые клетки, но в отличие от мезенхимальных клеток костного мозга они демонстрируют более высокую плотность в ткани, быстрее растут и доступны в большом количестве при сборе из небольшого объема жировой ткани. В результате в последнее время стволовые клетки жировой ткани становятся все более привлекательной и альтернативной популяцией мультипотентных клеток для исследования и для тканевой заместительной терапии. В этом обзоре мы подробно расскажем об иммунофенотипических особенностях мезенхимальных стволовых клетках жировой ткани, о влиянии локализации и возраста на пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток жировой ткани. Подробно остановимся на дифференцировке стволовых клеток в остеогенном направлении, как и по каким сигнальным путям она идет и какие факторы на нее влияют.

**Ключевые слова:** стволовые клетки жировой ткани, остеогенная дифференцировка, иммунофенотип, гены остеогенеза

## Immunophenotypic differences and osteoblastic differentiation of adipose-derived stem cells

E.G. Uchasova, Yu.A. Dyleva, E.V. Belik, O.V. Gruzdeva

"Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia

## Abstract

Due to a set of unique properties, for example, the ability to differentiate into various types of connective tissue cells, mesenchymal stem cells are attracting more and more attention from researchers. Until now, a large number of works have been devoted to the study of bone marrow stromal cells. However, recently, stem cells were also found in the stromal-vascular fraction of adipose tissue, but unlike bone marrow mesenchymal cells, they show a higher tissue density, grow faster, and are available in large numbers when collected from a small amount of adipose tissue. As a result, SCATs have recently become an increasingly attractive and alternative population of multipotent cells for research and for tissue replacement therapy. In this review, we will describe in detail the immunophenotypic features of adipose tissue mechenchymal stem cells, the influence of localization and age on the proliferation and differentiation of adipose tissue stem cells. Let us dwell in detail on the differentiation of stem cells in the osteogenic direction, how it goes along what signaling pathways, and what factors influence it.

**Keywords:** adipose-derived stem cells, osteogenic differentiation, immunophenotype, osteogenesis genes.

## Введение

Жировая ткань (ЖТ) является одной из самых распространенных тканей человека: в среднем составляет 15-25% массы его тела, имеет мезенхимальное происхождение и состоит из комбинации белой жировой ткани и бурой жировой ткани, причем каждый тип ткани имеет различные функции, морфологию и распределение. Основную часть жировой ткани составляют адипоциты: примерно 2/3 общего количества ткани, остальная часть — это различные типы клеток, составляющие так называемую стромально-васкулярную фракцию (СВФ).

В течение многих лет считалось, что гиперпластический рост жировой ткани обусловлен существованием унипотентной популяции клеток-предшественников, преадипоцитов. Однако в 2001 г. Zuk с соавт. выявили наличие в жировой ткани стволовых клеток с мультипотентным потенциалом дифференцировки во многом сходных с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга (СККМ), способные принимать остеогенные, хондрогенные, адипогенные и нейрогенные фенотипы посредством химически индуцированной дифференциации [1]. Кроме того, было показано, что в отличие от СККМ стволовые клетки ЖТ имеют значительно более высокую плотность в ткани, быстрее растут и доступны в большом количестве при сборе из небольшого объема жировой ткани. Например, только 0,001–0,01% мононуклеарных клеток в костном мозге являются стволовыми, в то время как из 1 г жировой ткани можно выделить  $5 \cdot 10^3$  стволовых клеток, что в 500 раз больше, чем из такого же количества клеток в костном мозге. В результате в последнее время стволовые клетки жировой ткани (СКЖТ) становятся все более привлекательной и альтернативной популяцией мультипотентных клеток как для исследований, так и для тканевой заместительной терапии.

В 2006 г. Международное общество клеточной терапии (ISCT) предложило минимальный набор критериев для идентификации МСК (мезенхимальные стволовые клетки):

1. Адгезия к пластику в культуре *in vitro*
2. Положительная экспрессия маркеров CD73, CD90 и CD105, но отсутствие экспрессии в отношении CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 и поверхностных молекул HLA-DR
3. Способность дифференцироваться в преадипоциты, хондроциты и остеобласты [4].

Учитывая различные источники МСК, в 2013 г. ISCT внесла небольшую корректировку в характеристики мезенхимальных клеток, выделенных из жировой ткани [2,3]. Помимо уже описанных положительных маркеров [4], были включены поверхностные маркеры CD13, CD29, CD44; к отрицательным маркерам были отнесены CD31 и CD235a. Кроме того, были описаны и другие маркеры, но их экспрессия на стволовых клетках ЖТ достаточно вариабельна и сильно зависит от условий культивирования

и количества пассажей [2]. СКЖТ считаются иммунологически привилегированными клетками, так как они не экспрессируют HLA-DR (главный комплекс гистосовместимости класса II, МНС II) и у них низкий уровень экспрессии МНС класса I, что обеспечивает им значительно сниженную иммуногенность по сравнению с другими типами клеток. Будучи метаболически активными, стволовые клетки жировой ткани играют важную роль в ревазуляризации поврежденной ткани, ингибировании апоптоза и иммуномодуляции. Эти стволовые клетки секретируют большое количество факторов внеклеточного матрикса и большое количество цитокинов, а также ростовых, ангиогенных и антиапоптотических факторов [5]. Считается, что большая часть положительных эффектов клеточной терапии с помощью СКЖТ вызвана секрецией этими клетками большого количества паракринных факторов [5].

## 1. Иммунофенотипические особенности СКЖТ

Стволовые клетки жировой ткани мозга локализуются в СВФ, присутствующей в сосудистой нише, имеют специфичный для этой области профиль экспрессии маркеров клеток. Клетки СВФ представляют собой гетерогенную смесь эндотелиальных, гладкомышечных клеток, перицитов, фибробластов, тучных клеток и преадипоцитов [6]. На ранних этапах культивирования (1-2 пассаж клеток) в составе СВФ регистрируются клетки, несущие маркеры гемопоэтических стволовых клеток (CD34, митохондриальный ALDH, ABCG2), которые в комбинации с CD31 и CD144 характеризуют эндотелиальные прогениторные популяции [2,6]. Процент таких клеток в составе СВФ до культивирования выше, чем в нефракционированном костном мозге. Кроме того, в другом исследовании было продемонстрировано наличие поверхностных маркеров рецептора VEGF (васкуло-эндотелиальный фактор роста сосудов), Flk-1 (рецептор VEGF – самый ранний известный маркер клеток эндотелиального происхождения), CD31 (PECAM-1 – молекула адгезии тромбоцит-эндотелиальных клеток), VE-кадгерина, фактора фон Виллебранда, связанных с линейкой эндотелиальных клеток [7,8]. Экспериментальная работа Mitchell J.B., выполненная на липоаспирате (плановая операция по липопластике), показала, что популяция СВФ содержит клетки предшественники макрофагов и, скорее всего, клетки других гемопоэтических линий [6]. Так, на поверхности СКЖТ была обнаружена экспрессия поверхностных маркеров CD11 (участвует в многочисленных ассоциациях, связанных с адгезией, между клетками, такими как моноциты, макрофаги, естественные клетки-киллеры и гранулоциты), CD14 (мембранный белок, экспрессированный на поверхности клеток миелоидного ряда), CD45 (белок, регулирующий Src-семейство киназ, который экспрессируется на поверхности всех гемопоэтических клеток) и других маркеров, однако экспрессия этих клеток теряется

при большом количестве пассажей (4-5) [8]. Кроме того, экспрессия некоторых CD маркеров долгое время оставалась спорной. Например, CD34 экспрессировали в клетках СВФ и свежеизолированных СКЖТ, в то время как его экспрессия исчезала после нескольких пассажей (на 4-5 пассаже) [9,10].

Получается, что на ранних этапах культивирования клеток СВФ обнаруживают низкие уровни стромально-ассоциированных маркеров (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166). И только к более поздним стадиям культивирования (3-4 пассаж) клетки приобретают более гомогенный профиль с высокими уровнями стромальных маркеров (90% к 4 пассажу). В целом этот временной паттерн экспрессии напоминает таковой, описанный для МСК, происходящих из костного мозга человека. К 4-5 пассажу поверхностные маркеры (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90) постоянно присутствуют у >90% популяции СКЖТ. Таким образом, классические маркеры стромальных стволовых клеток (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166) присутствуют на 0,8-54% на ранних стадиях выделения (1 пассаж) СВФ. При позднем пассаже стромальные маркеры присутствуют до 98% популяции стволовых клеток, полученных из жировой ткани [7]. Культуры СКЖТ содержат около 10-30% клеток, способных образовывать колонии и дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении [8]. Таким образом, популяция стволовых клеток жирового происхождения в настоящее время считается источником нескольких популяций стволовых и прогениторных клеток, различающихся по свойствам и потенциалу.

## 2. Влияние локализации жировой ткани на дифференцировку ее стволовых клеток

На способность и скорость стволовых клеток ЖТ к пролиферации и дифференцировке может влиять ее анатомическое расположение, условия культивирования, возраст донора, плотность посева и состав среды для культивирования.

Различия между жировой тканью различной локализации могут быть связаны с внутренними характеристиками клеток, находящихся в каждой ткани, включая стволовые клетки ЖТ. Действительно, между адипоцитами, полученными *in vitro* из СКЖТ подкожной и висцеральной локализации, были обнаружены различия [11]. Например, СКЖТ, выделенные из подкожной ЖТ, лучше и легче дифференцировались в зрелые адипоциты, чем висцеральные СКЖТ *in vitro*. В работе Tang Y. с соавт. было показано, что МСК, полученные из подкожной ЖТ у пациентов с ожирением (жировая ткань получена во время операции по снижению веса), демонстрируют большую способность к адипогенной дифференцировке, чем стволовые клетки из висцеральной ЖТ [12]. В другом исследовании эти данные не были подтверждены, а наоборот, было показано, что стволовые клетки висцеральной ЖТ лучше

дифференцируются в адипоциты [11]. Причиной таких различных результатов в исследованиях может быть то, что научными группами были выбраны различные методы выделения стволовых клеток, условия и время культивирования, количество пассажей и разные донорские популяции.

В другом исследовании Baglioni S. с соавт. пришли к выводу, что висцеральные СКЖТ являются более подходящей клеточной моделью *in vitro* для исследования молекулярных механизмов метаболических нарушений, таких как ожирение [13]. В другой экспериментальной работе было показано, что СК, полученные из подкожных жировых депо, имеют более высокую скорость роста и адипогенный потенциал, чем те, которые получены из висцеральных депо. Кроме того, адипоциты, полученные из подкожных СКЖТ, обладают большей способностью секретировать адипонектин и менее восприимчивы к липолизу, чем адипоциты, полученные из висцеральных стволовых клеток ЖТ. Следовательно, функциональные различия между подкожной и висцеральной ЖТ могут возникать из-за различий в депо-специфических стволовых клетках [14].

В настоящее время основная часть исследований посвящена изучению подкожных и висцеральных СКЖТ из-за возможности легкого забора клеток (чаще всего это косметологические операции удаления жира) и лишь небольшое количество работ посвящено изучению стволовых клеток жировой ткани из периваскулярной, кардиальной и других областей. Поскольку жировая ткань может прилегать ко всем сосудам и органам, кроме центральной нервной системы, такие жировые депо анатомически контактируют с адвентициальной стороной артерий и органов, что может играть важную роль в ремоделировании сосудов. Впервые Lin G. с соавт. выделили стволовые клетки из периваскулярной ЖТ и показали, что они экспрессируют как CD34, так и актин гладкой мускулатуры [15]. В этом исследовании ученые определили более точную локализацию стволовых клеток в ЖТ человека с использованием иммунофлуоресценции различных маркеров стволовых клеток SSEA (стадий-специфический эмбриональный антиген) 1, STRO-1 (маркер МСК) и OCT-4 (октамер-связывающий фактор транскрипции)-4 [15]. Было показано, что распространенный маркер МСК STRO-1 экспрессируется исключительно в эндотелии капилляров и артериол, но не в эндотелии артерий. Эмбриональный маркер стволовых клеток SSEA1 локализуется в перичитарном месте в капиллярах и в некоторых гладкомышечных клетках артериол. Клетки, экспрессирующие маркеры эмбриональных стволовых клеток теломеразу и OCT4 (транскрипционный фактор, содержащий гомеобокс), встречались редко и наблюдались только в капиллярах. На основании этих данных авторы сделали вывод, что СКЖТ являются сосудистыми клетками-предшественниками (стволовыми) на различных стадиях дифференцировки [15]. В целом существование периваскулярных СКЖТ

было подтверждено, но их функции и свойства остаются неизвестными [16].

Кардиальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани, — еще один новый тип стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, окружающей сердце. В соответствии с двумя различными жировыми депо МСК, полученные из жировой ткани, можно разделить на эпикардиальные и перикардиальные стволовые клетки. По сравнению с жировыми стволовыми клетками из других источников, эпикардиальные и перикардиальные клетки были склонны к дифференцировке в кардиомиоциты [17]. Более того, известно, что эпикардиальные СКЖТ обладают более высоким кардиомиогенным потенциалом, чем перикардиальные СКЖТ [18]. Wang X. с соавт. в экспериментальном исследовании показали, что эпикардиальные и перикардиальные стволовые клетки оказывают благотворное влияние на улучшение сердечной функции и ангиогенез в экспериментальной модели инфаркта миокарда, выполненной на мышах [19]. Также показано, что периваскулярные СКЖТ обеспечивают более мощную репаративную активность сердца, чем подкожные, так как они лучше дифференцировались в миогенной дифференцировке и васкулогенезе [20].

Таким образом, в настоящее время известно, что стволовые клетки из разных жировых депо имеют различную способность к пролиферации и дифференцировке. Кроме того, в зависимости от анатомического расположения жировой ткани различается дифференцированный потенциал стволовых клеток. Например, МСК, полученные из подкожных депо, больше склонны дифференцироваться в адипогенном направлении, клетки из эпикардиальной или перикардиальной ЖТ — в кардиомиоциты. Однако во многих исследованиях есть существенное ограничение: большая часть работ выполнена на экспериментальных животных, исследований, проведенных на клетках человека, особенно на жировых депо кардиальной локализации, единичное количество.

### 3. Влияние возраста донора на дифференцировку клеток жировой ткани

Существует ряд работ, изучающих влияние возраста на пролиферацию и дифференцировку СКЖТ, выполненных как на экспериментальных моделях животных, так и на человеке. Так, в работе Kawagishi пролиферативный, остеогенный и хондрогенный потенциалы не коррелировали с возрастом пациентов [21]. Напротив, в другом исследовании M. Zhu с соавт. сообщили о большей остеогенной способности СКЖТ у молодых пациентов (20–36 лет), чем у пациентов в возрасте от 37–46 лет, без существенной разницы в пролиферации. A Ciuffi S. с соавт. показали, что способность к пролиферации, экспрессии остеогенных генов (остеокальцин и щелочная фосфатаза) и остеогенного потенциала стволовых клеток в молодой группе (<30 лет) лучше,

чем в группе старше 35 лет [22]. Эти результаты подтвердили в другом исследовании, где показано, что скорость пролиферации, активность супероксиддисмутазы, экспрессия остеоопонтина, остеокальцина и костного морфогенного белка-2 (BMP-2) и потенциал дифференцировки СКЖТ значительно выше у молодых пациентов (старше 20 лет) по сравнению с группой более старшего возраста (>50 лет) [22]. Wu W. с соавт. провели сравнение мезенхимальных стволовых клеток в 3 различных возрастных группах (1 группа — младенцы до 1 года, 2 группа — пациенты в возрасте 15–45 лет и 3 группа — возраст от 51 до 71 года). В результате исследования было показано, что у младенцев до года более высокий уровень фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), связанного с Runt транскрипционного фактора 2 и выше экспрессия фактора роста-2 (FGF2) [23]. В исследовании Mancini O.K. с соавт. стволовые клетки были получены из жировой ткани пациентов с атеросклерозом, перенесших плановую операцию аортокоронарного шунтирования. Авторы сравнили фенотип МСК у пациентов старше и младше 65 лет и выяснили, что стволовые клетки пожилых имели больший клеточный размер, двукратное увеличение обеих уровней H2AX (маркер появления двухцепочечных разрывов) [24]. В целом, резюмируя все исследования, можно сказать, что старение оказывает неблагоприятное влияние (снижается скорость пролиферации, дифференцировки клеток, активность) на свойства мезенхимальных СКЖТ.

### 4. Дифференцировочный потенциал СКЖТ

СКЖТ имеют мезодермальное происхождение, но на данный момент показано, что они могут дифференцироваться в клетки эктодермального, энтодермального и мезодермального происхождения [2]. Известно, что СКЖТ могут дифференцироваться в адипогенные, остеогенные, хондрогенные линии. Позже было доказано, что СКЖТ могут дифференцироваться в миогенные, ангиогенные, кардиомиогенные, теногенные и пародонтогенные линии мезодермального происхождения. Дифференцировка СКЖТ *in vitro* индуцируется селективной средой, содержащей специфичные для линии факторы индукции [2,3]. Ниже мы подробно рассмотрим дифференцировку в остеогенном направлении.

#### 4.1. Остеогенная дифференцировка

Остеогенная дифференцировка МСК была первой дифференцировкой, идентифицированной Friedenstein и др. в конце 1960-х — начале 1970-х годов [25]. *In vitro* остеогенная дифференцировка происходит в среднем течение 1 месяца и приводит к образованию дифференцированных остеобластов. Дифференцировку остеобластов чаще всего оценивают по появлению активности щелочной фосфатазы и кальцификации матрикса, которую визуализируют

окрашиванием ализариновым красным (оценка наличия отложений кальция) и по Ван Коссу (оценка наличия минерализации) [26].

#### 4.2. Сигнальные пути, участвующие в остеогенной дифференцировке

Механизмы включения СКЖТ в линию остеобластов до сих пор не ясны, исследования сигнальных путей предоставили много информации о влиянии сигнальных молекул на миграцию клеток, адгезию, пролиферацию, дифференцировку и, в итоге, на формирование кости. Считается, что в организме активация сигнальных путей в направлении остеогенной дифференцировки из мезенхимальных стволовых клеток происходит в ответ на факторы стресса: ожирение, воспаление и оксидативный стресс [26, 27]. Основные сигнальные пути, ответственные за остеогенез: BMP, Wnt, FGF (fibroblast growth factor, ростовой фактор фибробластов) [26-28].

Одним из основных путей активации остеогенеза является путь BMPs (костные морфогенетические белки, относятся к суперсемейству TGF- $\beta$ ). Эта группа белков включает 20 BMP и составляет почти одну треть суперсемейства TGF- $\beta$  [28]. На основе гомологии и схожести функций BPS разделяют на 4 категории:

- 1) BMP 2,4
- 2) BMP 5,6,7,8a,8b
- 3) BMP 9,10
- 4) BMP 12,13,14

Белки BMP секретируются в активной форме и регулируются внеклеточными антагонистами, в остеогенезе участвуют в основном BMP 2, 4, 6, 9. У каждого из членов семейства имеется своя роль в организме. Например, BMP-2 являются маркером остеогенной дифференцировки как при нормальном остеогенезе, так и при кальцификации мягких тканей, и наиболее характерными для сердечно-сосудистой системы [27] и пролиферации стволовых клеток [29], а BMP-7 играет ключевую роль в дифференцировке провоспалительных моноцитов или макрофагов M1 в противовоспалительные макрофаги M2 [30].

BMP инициирует свой сигнальный каскад посредством связывания лиганда с гетеромерным комплексом серин/треонинкиназных рецепторов типа I и II (BMPRI-I и BMPRI-II) на клеточной поверхности [26]. После связывания BMPRI-II фосфорилирует BMPRI-I, который, в свою очередь, приводит к фосфорилированию C-терминального домена рецептор-активируемых белков Smad (Smad 2, 5 и 8) [31]. Эти фосфорилированные Smads образуют гетеродимерный комплекс со Smad4, перемещаются в ядро, где оказывают влияние на транскрипцию гена-мишени и способствуют остеогенной дифференцировке, запуская синтез факторов RUNX2 (Runx-связанный фактор транскрипции 2), остерикс (OSX-фактор транскрипции Sp7) и DLX5, ALP [31].

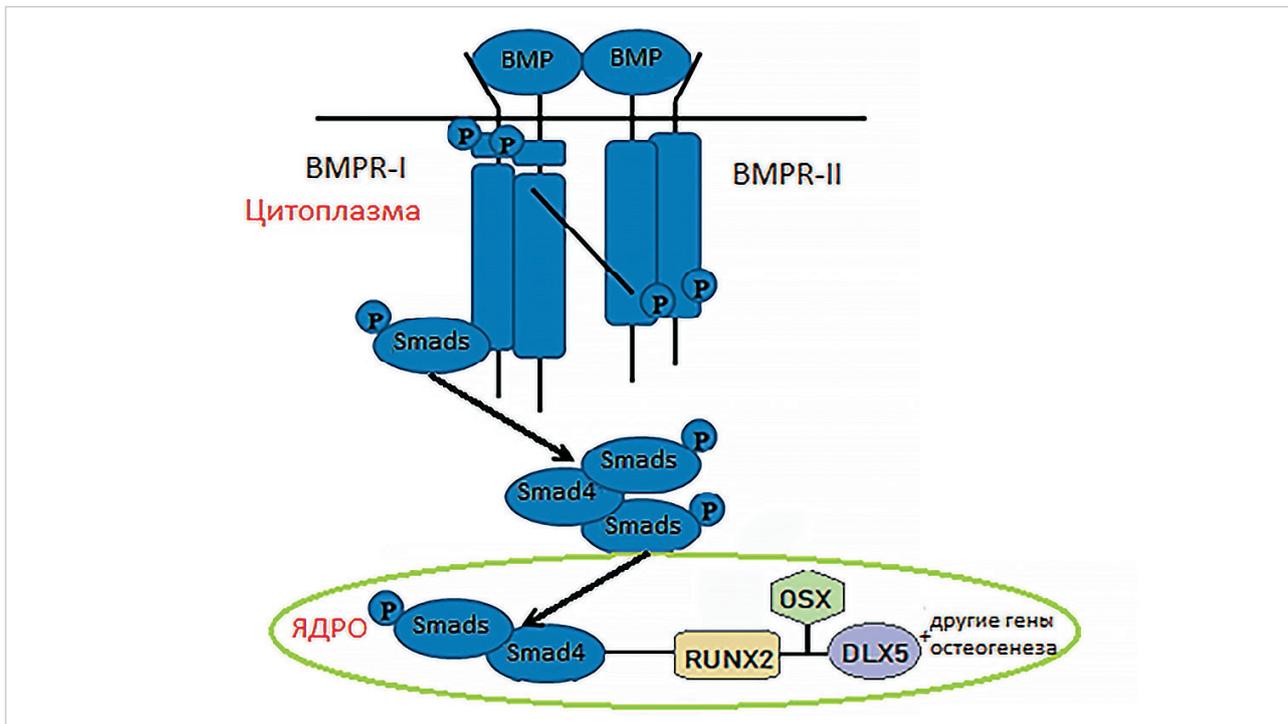
RUNX2 является первым описанным фактором транскрипции, специфичным для остеобластов, и ключевым в дифференцировке остеобластов. У мышей с нокаутом RUNX2 обнаруживается остановка дифференцировки остеобластов, что приводит к отсутствию пролиферации и дифференцировки остеобластов [32]. Для людей с гетерозиготной мутацией в гене RUNX2 характерна ключично-черепная дисплазия – это заболевание, при котором нарушается развитие костей черепа, а также может быть полное или частичное отсутствие ключиц [33].

Остерикс (OSX) принадлежит к подгруппе (Sp) Kruppel-like семейства транскрипционных факторов [34]. OSX – это белок, который инициирует развитие предшественников остеобластов в зрелые остеобласты и является мишенью BMP2. Предполагается, что в сигнальном пути RUNX2 стоит выше остерикса, поскольку исследования показали, что у мышей без RUNX2 остерикс не экспрессируется, тогда как у мышей с нулевым OSX экспрессируется RUNX2 [32,34].

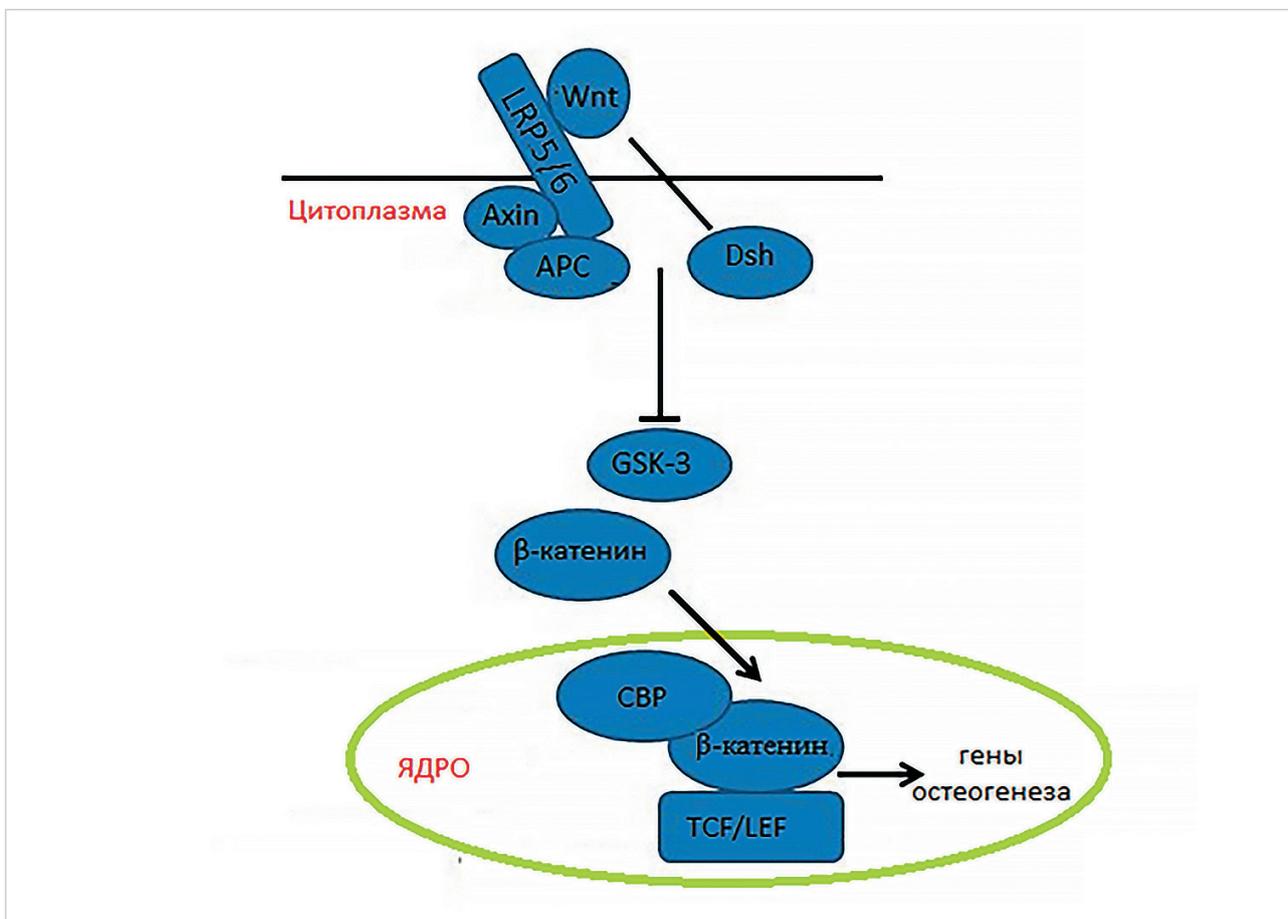
DLX5 (белок, который у человека кодируется дистальным геном гомеобокса 5 или геном DLX5) экспрессируется на ранних стадиях остеогенеза и предполагается, что он играет центральную роль в его регуляции [34]. В исследовании N. Holleville и соавт. было показано [33], что DLX5 может играть важную роль в хондрогенезе и остеогенезе. DLX5 инициирует остеогенную дифференцировку, запуская экспрессию RUNX2, OSX, щелочной фосфатазы и других генов (рис. 1).

Второй сигнальный путь, по которому происходит активация пролиферации и дифференцировки остеобластов – это путь Wnt/ $\beta$ -катенин. Семейство Wnt состоит из большого количества секретируемых гликопептидов, которые участвуют в эмбриональном развитии и индукции тканей [34]. Считается, что большинство белков Wnt действуют как лиганды для комплексов рецепторов клеточной поверхности, состоящих из членов семейства frizzled (Fz) и липопротейнов низкой плотности (LDL)-рецептор-родственный белок 5/6 (LRP5/6). Wnts связывают рецепторный комплекс, состоящий из LRP5/6 и одного из десяти белков Fz и предотвращает фосфорилирование  $\beta$ -катенина с помощью GSK3 $\beta$  (гликогенсинтаза киназа  $\alpha$ -3 бета) и других киназ и его последующую деградацию. Следует отметить, что мутация остатков, которые могут быть фосфорилированы в аланин, создает стабильный  $\beta$ -катенин. Далее происходит накопление  $\beta$ -катенина и его перемещение в ядро, где он взаимодействует с белками семейства транскрипционных факторов TCF/LEF (фактор T-клеток/лимфоидный энхансер) и с CREB-связывающим белком (CBP), чтобы регулировать экспрессию генов остеогенеза. Таким образом,  $\beta$ -катенин необходим для пролиферации и дифференцировки остеобластов и поддерживает работу остеогенной транскрипционной программы (Рис. 2).

**Рисунок 1.** BMPs сигнальный путь активации остеогенеза стволовых клеток жировой ткани



**Рисунок 2.** Wnt/ $\beta$ -катениновый путь активации остеогенеза

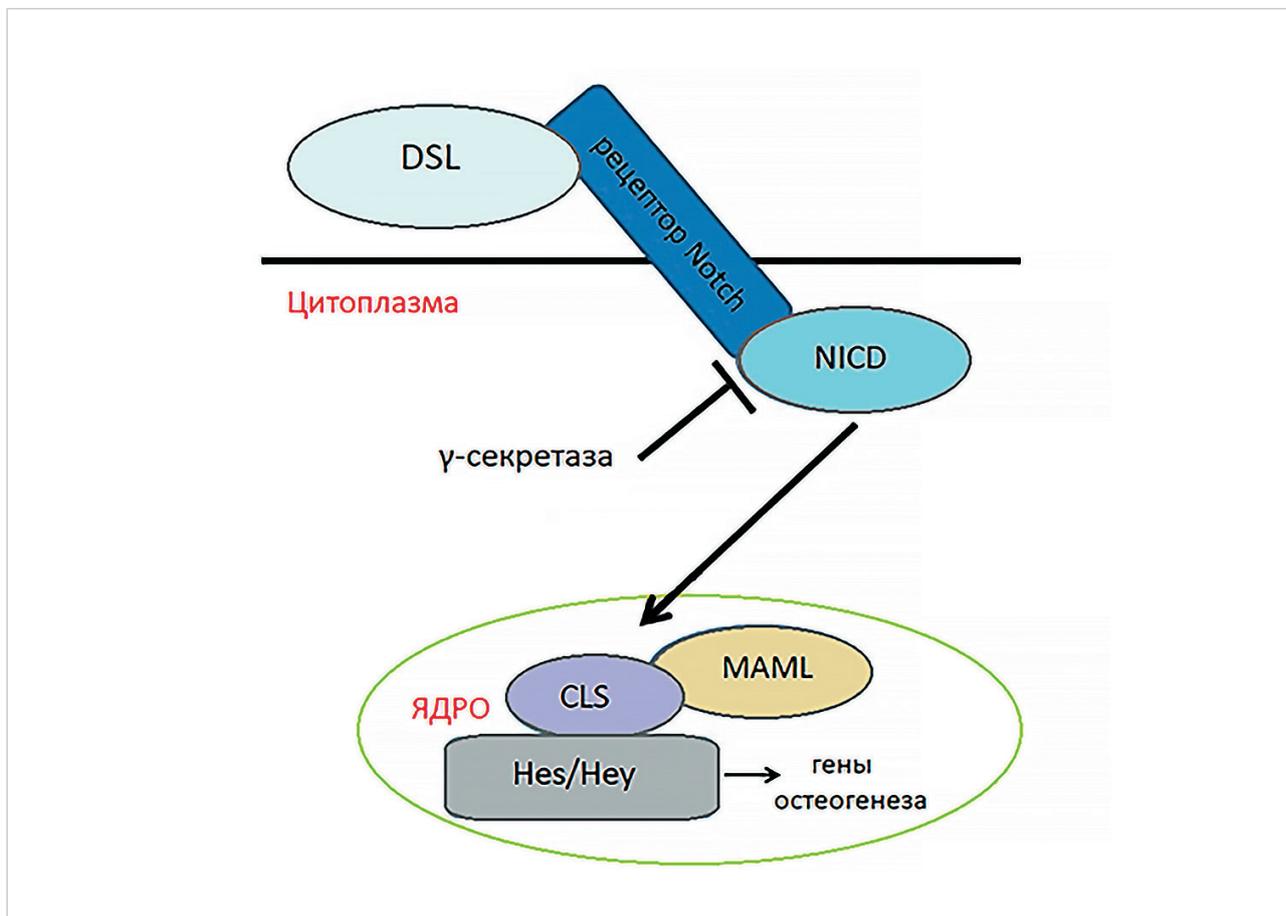


Повышенная продукция BMP2, 4 перицитами и эндотелиальными клетками стенки сосуда приводит к активации сигнальных путей Msx2-Wnt: TNF- $\beta$  активирует BMP2 и Msx2 (протеиновый гомеобокс-гомолог мышечного сегмента, активатор транскрипции), которые вызывают экспрессию белков семейства Wnt-Wnt3a, Wnt7a и ALP (щелочная фосфатаза), снижают уровень ингибитора кальцификации Dkk1. В результате активации сигнального пути Wnt в адвентиции в ответ на продукцию BMP в меди сосуда происходит накопление  $\beta$ -катенина, активация ALP и остеогенная дифференцировка [34].

Еще один сигнальный путь Notch регулирует уровень проостеогенного сигнального пути BMP2 (Рис. 3). Повышение экспрессии Notch1 повышает чувствительность сосудистых гладкомышечных клеток к проостеогенному действию BMP2. Передача сигналов Notch играет критическую роль в развитии и регенерации стволовых клеток/клеток-предшественников [35]. Известно, что система Notch является эволюционно консервативным механизмом, который уравнивает пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток/клеток-предшественников [36]. Рецептор Notch представляет собой трансмембранный белок, который во время созревания может расщепляться фуриноподобной конвертазой (по S1) в транс-Гольджи с образованием нековалентно ассоциированного

гетеродимера на клеточной поверхности. Передача сигналов Notch инициируется, когда лиганд Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) на клеточной поверхности, связывается с рецепторами Notch (Notch-1, -2, -3 и -4), экспрессируемыми на противоположной клеточной поверхности. Эндоцитоз комплекса Notch-лиганд клетками, экспрессирующими лиганд, приводит к опосредованному металлопротеазой ADAM (семейство трансмембранных и секретируемых белков длиной около 750 аминокислот) расщеплению и удалению внеклеточного фрагмента гетеродимера. Связанный с мембраной фрагмент затем расщепляется комплексом  $\gamma$ -секретазы с высвобождением внутриклеточного домена Notch (NICD). Он транспортируется в ядро и собирается в комплекс активации транскрипции, ССААТ-связывающий белок (CSL, CBF-1) [36]. Эта новая сборка действует как репрессор транскрипции без существования NICD, который рекрутирует корепрессорный комплекс и ингибирует транскрипцию генов-мишеней, содержащих сайты связывания ССААТ [37]. Как последовательность связывания, NICD замещает корепрессорный комплекс CSL и рекрутирует ядерные коактиваторы, такие как mastermind-like 1 (MAML1) и гистоновые ацетилазы (56), превращая CSL в активатор транскрипции. Активация Notch посредством взаимодействия CSL-NICD может, в свою очередь,

**Рисунок 3.** Сигнальный путь Notch активации остеогенеза



активировать транскрипцию генов-мишеней, включая *Hes*, *Hey*. Эти 2 класса родственных белков считаются основными транскрипционными мишенями активации Notch [37, 38].

На данный момент в литературе очень много противоречивых данных о роли Notch-пути в остеогенезе. Так в работе Liu P. и соавт., выполненной на мышиных преosteобластах, было показано, что Notch подавляет созревание остеобластов путем связывания NICD или генов-мишеней Notch, *Hes* и *Hey* с RUNX2 [39]. Недавние работы с использованием клеточных моделей показали, что Notch способствует остеогенной дифференцировке [40]. На клеточных культурах было показано, что активация сигнального пути Notch может как активировать [40], так и ингибировать дифференцировку и минерализацию остеобластов [41]. Таким образом, четких данных о роли сигнального пути Notch в процессе дифференцировки на сегодняшний день нет.

### 4.3. Факторы, влияющие на остеогенную дифференцировку стволовых клеток жировой ткани

Многочисленные исследования показали важность значения фактора роста эндотелия сосудов на развитие остеогенеза [42]. VEGF является одним из наиболее важных медиаторов ангиогенеза, кроме того, он может способствовать остеогенезу. В работе Zhang с соавт. было показано, что существует сильная связь VEGF и BMP. BMP вызывает внутриклеточные сигналы, вызывающие дифференцировку клеток-предшественников в остеобласты [43]. Добавление VEGF и BMP6 в остеогенную среду *in vitro* приводило к увеличению экспрессии щелочной фосфатазы и генов, связанных с остеогенезом, – *OSX*, *DLX5* (дистальный гомеобокс 5), а также клеток минерализации [42]. Подобный эффект наблюдался при добавлении BMP 2, 4 и 9 к VEGF [43].

Витамин 1,25(OH)2D3 – еще один компонент, который в экспериментальных работах добавляют в остеобластную среду. Так, в исследовании было показано, что активная форма витамина D3 способствует остеогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток и ускоряет экспрессию маркерных генов остеобластов [42]. В работе другой исследовательской группы Kveiborg с соавт. показали, что 1,25(OH)2D3 способен компенсировать в стареющих остеобластах *in vitro* снижение экспрессии генов, которое обычно требуется для функциональности остеобластов [44]. Кроме того, 1,25(OH)2D3 является важным регулятором RUNX2, с которым он сотрудничает в индукции экспрессии остеокальцина, то есть ключевого белка, регулирующего минерализацию костного матрикса [45].

Еще один фактор, оказывающий влияние на дифференцировку стволовых клеток, полученных из жировой ткани – это гипоксия. Было замечено, что культура СКЖТ в условиях с низким уровнем

кислорода (1-2%) увеличивает жизнеспособность и способность клеток к пролиферации. Этот эффект можно объяснить тем, что физиологическое давление кислорода в жировой ткани обычно <3%, таким образом, СКЖТ располагаются в анатомических участках, которые относительно дефицитны по уровню кислорода. Низкое напряжение кислорода является важным компонентом микроокружения стволовых клеток (ниша стволовых клеток) и обеспечивает сигналы, способствующие поддержанию функции стволовых клеток [46]. Несмотря на низкую концентрацию кислорода в микроокружении стволовых клеток, стволовые клетки в экспериментальных условиях обычно культивируют в нормоксических условиях, соответствующих атмосферному кислороду (около 21%). Культивирование СКЖТ в более физиологически релевантных условиях низкого давления кислорода может однозначно улучшить их экспансию, дифференцировку, адгезию, секрецию фактора роста и регенеративный потенциал. В нескольких недавних исследованиях изучалось влияние пониженного давления кислорода на человеческие СКЖТ с удивительно контрастирующими результатами [46,47]. Низкие уровни кислорода (2%) снижают остеогенную и адипогенную дифференцировку СКЖТ, тогда как умеренная гипоксия (5%), как сообщается, снижает скорость пролиферации, но увеличивает хондрогенный потенциал СКЖТ [47]. Благоприятное влияние гипоксической культуры на пролиферацию и потенциал дифференцировки *in vitro* и *in vivo* человеческих МСК было отмечено несколькими группами. Hung S.P. с соавт. продемонстрировали, что СКЖТ, культивируемые в условиях гипоксии с 1% O<sub>2</sub>, имеют повышенную пролиферацию с повышенной экспрессией транскрипционных факторов NANOG (транскрипционный фактор, участвующий в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток), SALL4 (Sal-подобный белок 4, известен как ключевой фактор роста эмбриональных стволовых клеток) [48]. Дифференцировка МСК в условиях гипоксии благоприятствовала остеогенезу, тогда как адипогенез подавлялся. Тамата К. с соавт. обнаружили, что гипоксические условия способствуют самообновлению СКЖТ за счет сохранения образования колоний у ранних предшественников при сохранении недифференцированных фенотипов. Гипоксические состояния обратимо уменьшали остеогенную и адипогенную дифференцировку и повышали секрецию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста гепатоцитов (HGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) зависимым от гипоксии фактором (HIF)[49].

### Заключение

МСК составляют от 0,001 до 0,01% от всех клеток костного мозга, что требует очень длительной культивации полученного материала для

получения достаточного количества клеток. При этом СКЖТ очень похожи на СККМ, но насыщенность жировой ткани стволовыми клетками в 1000 раз превышает таковую в костном мозге. Кроме того, относительная простота и низкая травматичность получения жировой ткани и возможность выделения из нее достаточного количества стволовых клеток с последующей их дифференцировкой в различные ткани делает эти клетки весьма привлекательным объектом для изучения как с фундаментальной, так с клинической точки зрения.

## Финансирование

Работа выполнена в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0002 (период выполнения 2022-2026 гг.) «Разработка инновационных моделей управления риском развития болезней системы кровообращения с учетом коморбидности на основе изучения фундаментальных, клинических, эпидемиологических механизмов и организационных технологий медицинской помощи в условиях промышленного региона Сибири».

## Financing

The work was carried out within the framework of the fundamental topic of the Research Institute of the KPSS No. 0419-2022-0002 (duration period 2022-2026) "Development of innovative models for managing the risk of developing diseases of the circulatory system, taking into account comorbidity based on the study of fundamental, clinical, epidemiological mechanisms and organizational technologies medical care in the conditions of the industrial region of Siberia".

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Список литературы / References

1. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Katz AJ, Benbaim P, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies *Tissue Eng.* 2001;7:211-228. doi: 10.3389/fcell.2020.00561.
2. Robert AW, Marcon BH, Dallagiovanna B, Shiginov P. Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:561. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006.
3. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the international So. *Cytother.* 2013;15:641-648. doi: 10.1080/2000656X.2020.1772799.
4. Bucan A, Dhumale P, Jurgensen MG, Dalaei F, Wiinbolt A, Hansen CR, et al. Comparison between stromal vascular fraction and adipose derived stem cells in a mouse lymphedema model. *J Plast Surg Hand Surg.* 2020;54(5):302-311. doi: 10.1080/2000656X.2020.1772799.
5. Krawczenko A, Klimczak A. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2425. doi: 10.3390/ijms23052425.
6. Mitchell JB, Mcintosh K, Zvonice S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers *Stem. Cells.* 2006;24(2):376-385. doi: 10.1634/stemcells.2005-0234.
7. Gütherström C, Walther-Jallow L. Stem Cell Therapy as a Treatment for Osteogenesis Imperfecta. *Curr Osteoporos Rep.* 2020;18:337-343. doi: 10.1007/s11914-020-00594-3.
8. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):168. doi: 10.1186/s13287-018-0914-1.
9. Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, Deng YH, Tsai FC, Deng WP. Revisiting the Advances in Isolation, Characterization and Secretome of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2200. doi: 10.3390/ijms19082200.
10. Dykstra JA, Facile T, Patrick RJ, Francis KR, Milanovich S, Weimer JM, et al. Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(4):1096-1108. doi: 10.1002/sctm.16-0337.
11. Silva KR, Baptista LS. Adipose-derived stromal/stem cells from different adipose depots in obesity development. *World J Stem Cells.* 2019;11(3):147-166. doi: 10.4252/wjsc.v11i3.147.
12. Tang Y, Pan ZY, Zou Y, He Y, Yang PY, Tang QQ, et al. A comparative assessment of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat as a potential cell source for knee osteoarthritis treatment. *J Cell Mol Med.* 2017;21(9):2153-2162. doi: 10.1111/jcmm.13138.
13. Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, et al. Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One.* 2012;7:e36569. doi: 10.1371/journal.pone.0036569.

14. Schipper BM. Regional Anatomic and Age Effects on Cell Function of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Ann Plast Surg.* 2008;60(5):538-544. doi: 10.1097/SAP.0b013e3181723bbe.
15. Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008;17:1053-1063. doi: 10.1089/scd.2008.0117.
16. Hardy WR, Moldovan NI, Moldovan L, Livak KJ, Datta K, Goswami C, et al. Transcriptional Networks in Single Perivascular Cells Sorted from Human Adipose Tissue Reveal a Hierarchy of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2017;35:1273-1289. doi: 10.1002/stem.2599.
17. Nagata H, Ii M, Kobayashi E, Hosbiga M, Guo YL, Lue TF, et al. Cardiac Adipose-Derived Stem Cells Exhibit High Differentiation Potential to Cardiovascular Cells in C57BL/6 Mice. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5:141-151. doi: 10.5966/sctm.2015-0083.
18. Wystrychowski W, Patlolla B, Zhuge Y, Neofytou E, Robbins RC, Beygui RE, et al. Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:84. doi: 10.1186/s13287-016-0343-y.
19. Wang X, Zhang H, Nie L, Xu L, Chen M, Ding Z. Myogenic differentiation and reparative activity of stromal cells derived from pericardial adipose in comparison to subcutaneous origin. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:92. doi: 10.1186/srct481.
20. Ni H, Zhao Y, Ji Y, Shen J, Xiang M, Xie Y. Adipose-derived stem cells contribute to cardiovascular remodeling. *Aging.* 2019;11(23):11756-11769. doi: 10.18632/aging.102491.
21. Kawagishi-Hotta M, Hasegawa S, Igarashi T, Yamada T, Takahashi M, Numata S, et al. Enhancement of individual differences in proliferation and differentiation potentials of aged human adipose-derived stem cells. *Regen Ther.* 2017;6:29-40. doi: 10.1016/j.reth.2016.12.004.
22. Ciuffi S, Zonefrat R, Brandi ML. Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2017;14(2):217-226. doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.217.
23. Wu W, Niklason L, Steinbacher DM. The effect of age on human adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2013;131(1):27-37. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182729cfc.
24. Mancini OK, Shum-Tim D, Stochaj U, Correa JA, Colmegna I. Age, atherosclerosis and type 2 diabetes reduce human mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):140. doi: 10.1186/s13287-015-0127-9.
25. Hanna H, Mir LM, Andre FM. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):203. doi: 10.1186/s13287-018-0942-x.
26. Grottkau BE, Lin Y. Osteogenesis of Adipose-Derived. *Stem Cells Bone Res.* 2013;1(2):133-145. doi: 10.4248/BR201302003.
27. Zhou N, Li Qi, Lin X, Hu N, Datta K, Goswami C, et al. BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells. *Cell Tissue Res.* 2016;366(1):101-111. doi: 10.1007/s00441-016-2403-0.
28. Rogers MB, Shab TA, Shaikh NN. Turning Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) on and off in Mesenchymal Cells. *J Cell Biochem.* 2015;116(10):2127-2138. doi: 10.1002/jcb.25164.
29. Liu L, Wang Y, Yan R, Liang L. BMP-7 inhibits renal fibrosis in diabetic nephropathy via miR-21 downregulation. *Life Sci.* 2019;238:116957. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116957.
30. Narasimbulu GA, Singla DK. The Role of Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7) in Inflammation in Heart Diseases. *Cells.* 2020;9(2):280. doi: 10.3390/cells9020280.
31. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390:465-471. doi: 10.1038/37284.
32. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Bebringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002;108(1):17-29. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00622-5.
33. Holleville N, Mateos S, Bontoux M, Bollerot K, Monsoro-Burq AH. *Dlx5* drives *Runx2* expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme. *Dev Biol.* 2007;304(2):860-874. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.01.003.
34. Hagb MF, Noruzinia M, Mortazavi Y, Soleimani M, Kaviani S, Abroun S, et al. Different Methylation Patterns of *RUNX2*, *OSX*, *DLX5* and *BSP* in Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Spring.* 2015;17(1):71-82. doi: 10.22074/cellj.2015.513.
35. Clara JA, Monge C, Yang Y, Takebe N. Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells – a clinical update. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17:204-232. doi: 10.1038/s41571-019-0293-2.
36. Chillakuri CR, Sheppard D, Lea SM, Handford PA. Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23:421-428. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.01.009.
37. Sprinzak D, Blacklow SC. Biophysics of Notch Signaling. *Annu Rev Biophys.* 2021;50:157-189. doi: 10.1146/annurev-biophys-101920-082204.
38. Matsuno K. Notch signaling. *Dev Growth Differ.* 2020;62(1):3. doi: 10.1111/dgd.12642.
39. Liu P, Ping Y, Ma M, Zhang D, Liu C, Zaidi S, et al. Anabolic actions of Notch on mature bone. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(15):2152-2161. doi: 10.1073/pnas.1603399113.
40. Liao J, Wei Q, Zou Y, Fan J, Song D, Cui J, et al. Notch Signaling Augments BMP9-Induced Bone Formation by Promoting the Osteogenesis-Angiogenesis Coupling Process in Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(5):1905-1923. doi: 10.1159/000471945.

41. Cui J, Zhang W, Huang E, Wang J, Liao J, Li R, et al. BMP9-induced osteoblastic differentiation requires functional Notch signaling in mesenchymal stem cells. *Lab Invest.* 2019; 99(1):58-71. doi: 10.1038/s41374-018-0087-7.
42. Tauer JT, Robinson ME, Rauch F. Osteogenesis imperfecta: new perspectives from clinical and translational research. *JBMR Plus.* 2019;3(8):e10174. doi: 10.1002/jbm4.10174.
43. Zhang Y, Cheng N, Miron R, Shi B, Cheng XT. Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects. *Biomaterials.* 2012;33(28):6698-6708. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.021.
44. Kveiborg M, Rattan SIS, Clark BFC, Eriksen EF, Kassem M. Treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D3 reduces impairment of human osteoblast functions during cellular aging in culture. *J Cell Physiol.* 2001;186(2):298-306. doi: 10.1002/1097-4652(200002)186:2<298::aid-jcp1030>3.0.co;2-b.
45. Posa F, Benedetto AD, Colaianni G, Cavalcanti-Adam EA, Porro C, Trotta T, et al. Vitamin D Effects on Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Dental Tissues. *Stem Cells Int.* 2016;9150819. doi: 10.1155/2016/9150819.
46. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell.* 2010;7:150-161. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.007.
47. Lee JH, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341:882-888. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.038.
48. Hung SP, Ho JH, Shib YR, Lo T, Lee OK. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop. Res.* 2012;30:260-266. doi: 10.1002/jor.21517.
49. Tamama K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, Guan J. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *J Cell Biochem.* 2011;112:804-817. doi: 10.1002/jcb.22961