

Дифференцировка клеток линии ATDC 5 в присутствии пептидных факторов

Перспективной *in vitro* моделью для изучения механизмов дифференцировки клеток в хондрогенном и остеогенном направлениях является клеточная линия тератокарциномы мыши ATDC5, которая в определённых условиях последовательно претерпевает стадии цитодифференцировки, характерные для хондроцитов и остеобластов [1]. В работе были подобраны и оптимизированы условия дифференцировки клеток ATDC5 и оценен эффект пептидных факторов на цитодифференцировку. Дифференцирующая среда DMEM/F12 содержала трансферрин, пируват натрия и аскорбиновую кислоту. Экспериментально подобрана концентрация аскорбиновой кислоты (20 мкг/мл), не ингибирующая рост клеток ATDC5.

В качестве пептидных факторов дифференцировки исследованы рекомбинантный человеческий инсулин и препарат криптопептида CP1, которые добавляли в среду через каждые 48 ч. Клетки фиксировали 4% раствором п-формальдегида, окрашивали ализариновым красным С (1%, рН 4,3) и альциановым синим (1%, рН 2,5) и регистрировали светлостимульные оптические микрофотографии клеток. Дополнительно, живые клетки лизировали и детектировали в лизате уровень активности щелочной фосфатазы (ЩФ) с использованием п-нитрофенола в качестве субстрата в ферментативной реакции.

Установлено, что под действием инсулина большая часть первичной клеточной популяции приобретает фенотипические признаки, характерные для дифференцированных клеток (уменьшенные размеры, округлая форма). По сравнению с необработанными клетками более интенсивно окрашиваются ядро, ядрышки, элементы гранулярной ЭПС и аппарата Гольджи. В цитоплазме выявляется значительное количество секреторных вакуолей. Из полученного можно сделать вывод о том, что условия дифференцировки были подобраны правильно и оказывают благоприятное воздействие на клетки ATDC5. Обнаружено, что под действием препарата CP1 усиливаются процессы цитодифференцировки: увеличивается общее количество видоизменённых округлых клеток и интенсивность окраски красителями альциановым синим и ализариновым красным. Полученные результаты были подтверждены количественным анализом микрофотографий, произведённым в программе ImageJ. В качестве маркера остеогенной дифференцировки определяли уровень фермента ЩФ в лизате клеток. Также установлено стимулирующее влияние препарата CP1 на процесс биосинтеза ЩФ клетками в количестве, в 2,27 раз пре превышающем контрольные значения.

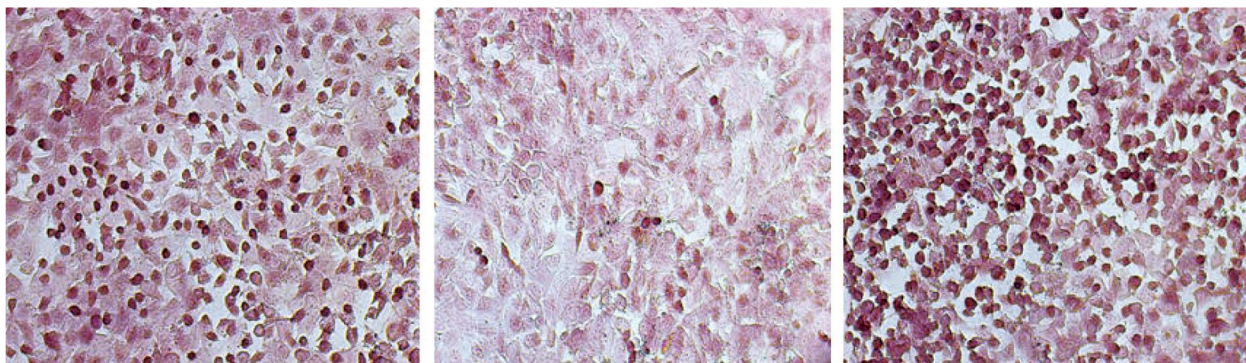


Рис. 1. Клетки ATDC5, окраска ализариновым красным: А – клетки, обработанные инсулином; Б – необработанные клетки; В – клетки, обработанные CP1 и инсулином

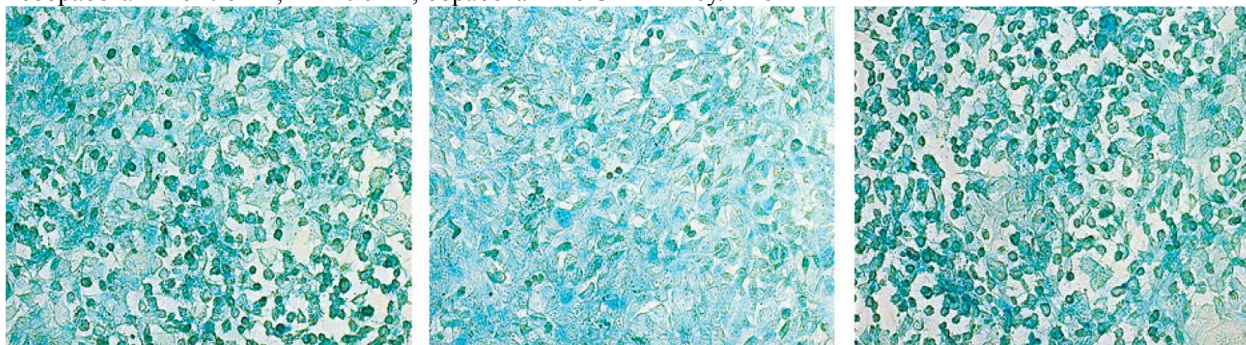


Рис. 2. Клетки ATDC5, окраска альциановым синим: А – клетки, обработанные инсулином; Б – необработанные клетки; В – клетки, обработанные CP1 и инсулином

Таким образом, установлено, что препарат CP1 усиливает действие инсулина на дифференцировку клеток ATDC5. Полученные данные в совокупности свидетельствуют об индукции инсулином дифференцировки клеток в хондрогенном и остеогенном направлениях и активации синтезирующей активности клеток (синтез гликозаминогликанов и отложение кальцийсодержащих соединений в цитоплазме), типичной для более дифференцированных клеток. Препарат криптического пептида CP1 может быть использован в качестве индуктора процесса остеогенной дифференцировки клеток ATDC5.

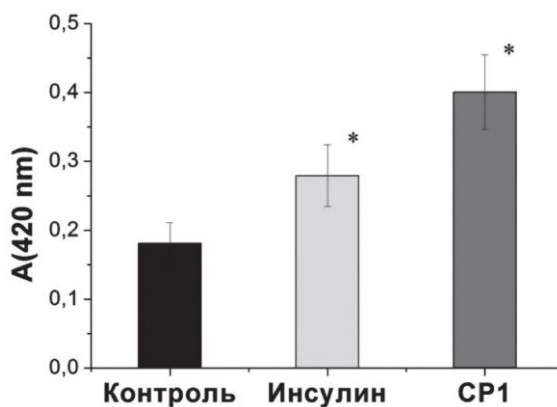


Рис. 3. Уровень щелочной фосфатазы в лизате клеток ATDC5

Литература:

1. Tare, R. ATDC5: and Ideal Cell Line for Development of Tissue Engineering Strategies Aimed at Cartilage Generation [Text] / R. Tare, D. Howard, J. Pound, H. Roach, R. Oreffo // *European Cells & Materials*. – 2005. – Т.10, № 2. – P. 22.

Финансирование исследования: 1. Государственная программа повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета (КФУ) среди ведущих мировых научно-образовательных центров, 2. Программа «УМНИК» Фонда содействия инновациям.