

МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ MORPHOLOGY, PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

ВЛИЯНИЕ N,N-ДИМЕТИЛИМИДДИКАРБОИМИДА ДИАМИДА (МЕТФОРМИНА ГИДГОХЛОРИДА) НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Слесарева Т.А.^{1,2},
Горбатовская Е.Е.^{1,2},
Дылева Ю.А.¹,
Долматова С.Е.^{1,2},
Фанаскова Е.В.¹,
Двадцатов И.В.¹,
Гусев С.М.¹,
Груздева О.В.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, г. Кемерово, бульвар им. акад. Л.С. Барбараша, стр. 6, Россия)

² ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» (650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова 22а, Россия)

Автор, ответственный за переписку:

**Слесарева Тамара
Александровна,**

e-mail: soloveva081296@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. На сегодняшний день не разработано специфических методов профилактики и терапии коронарного кальциноза. Анализ литературы показал, что использование определённых фармакологических препаратов у пациентов с ишемической болезнью сердца существенно снижает риск развития данного патологического состояния. Препараты, механизм действия которых заключается в регуляции клеточного метаболизма, могут служить перспективным средством для управления остеогенной дифференцировкой мультипотентных клеток в сердечно-сосудистой системе и, как следствие, предотвращать появление массивного кальциноза сосудов сердца.

Цель. Оценить влияние разных концентраций N, N-диметилимиддикарбоимида диамида (ДМКД) на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК) эпикардиальной жировой ткани (ЭЖТ).

Методы. МСК получали из биоптатов ЭЖТ, взятых во время операции коронарного шунтирования. Культуры клеток пассировали до 3-го пассажа, после чего проводили иммунофенотипирование и остеогенную дифференцировку. Для дифференцировки МСК использовали остеогенную среду нативно и с добавлением 10, 50 и 100 мкмоль ДМКД. Оценку остеогенеза проводили по измерению уровня в супернатантах клеточных культур белков (RUNX2, остеопонтина, щелочной фосфатазы) и окрашивания клеточных культур с последующим определением интенсивности окраски.

Результаты. На протяжении дифференцировки клетки, инкубирующиеся в среде с добавлением 50 мкмоль ДМКД демонстрировали высокие уровни синтетической активности остеогенных белков. Остеобласты, дифференцировавшиеся с добавлением 50 мкмоль ДМКД, синтезировали в 1,1 раза больше кальция по сравнению с МСК, инкубирующихся с другими концентрациями ДМКД, и в 1,3 раза больше, чем в контрольных культурах ($p = 0,001$).

Вывод. Добавление ДМКД в среды для дифференцировки МСК ЭЖТ пациентов с ИБС значительно усиливает синтез ключевых маркеров остеобластной дифференцировки. Особенно выраженное влияние было отмечено при концентрации 50 мкмоль препарата.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, N,N-диметилимиддикарбоимид диамид, остеогенная дифференцировка, эпикардиальная жировая ткань, кальцификация коронарных артерий, метформин

Статья поступила: 12.12.2025

Статья принята: 04.05.2026

Статья опубликована: 22.05.2026

Для цитирования: Слесарева Т.А., Горбатовская Е.Е., Дылева Ю.А., Долматова С.Е., Фанаскова Е.В., Двадцатов И.В., Гусев С.М., Груздева О.В. Влияние N,N-диметилимиддикарбоимида диамида (метформина гидгохлорида) на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток эпикардиальной жировой ткани. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(2): 108-117. doi: 10.29413/ABS.2026-11.2.11

EFFECT OF N,N-DIMETHYLIMIDEDICARBOIMIDE DIAMIDE (METFORMIN HYDROCHLORIDE) ON OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS OF EPICARDIAL ADIPOSE TISSUE

Slesareva T.A.^{1,2},
Gorbatovskaya E.E.^{1,2},
Dyleva Yu.A.¹,
Dolmatova S.E.^{1,2},
Fanaskova E.V.¹,
Dvadtsatyov I.V.¹,
Gusev S.M.¹,
Gruzdeva O.V.^{1,2}

¹ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (Academician L.S. Barbarash Blvd., 6, Kemerovo 650002, Russian Federation)

² Kemerovo State Medical University (Voroshilova str., 22a, Kemerovo 650056, Russian Federation)

Corresponding author:

Tamara A. Slesareva,

e-mail: soloveva081296@mail.ru

RESUME

Background. To date, no specific methods for the prevention and treatment of coronary artery calcification have been developed. A literature analysis demonstrates that the use of certain pharmacological agents in patients with coronary artery disease significantly reduces the risk of developing this pathological condition. Drugs whose mechanism of action involves regulating cellular metabolism may serve as a promising tool for managing osteogenic differentiation of multipotent cells in the cardiovascular system and, consequently, preventing the development of massive calcification of cardiac vessels.

The aim. To evaluate the effect of different concentrations of N,N-dimethylimidicarboimide diamide (DMDC) on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from epicardial adipose tissue (EAT).

Methods. MSCs were isolated from EAT biopsies collected during coronary artery bypass grafting. Cell cultures were passaged to the third passage, after which immunophenotyping and osteogenic differentiation were performed. For MSC differentiation, osteogenic medium was used, either native or supplemented with 10, 50, and 100 μmol DMDC. Osteogenesis was assessed by measuring protein levels (RUNX2, osteopontin, alkaline phosphatase) in cell culture supernatants and staining the cell cultures with subsequent determination of staining intensity.

Results. Throughout differentiation, cells incubated in medium supplemented with 50 μmol DMDC demonstrated high levels of osteogenic protein synthesis. Osteoblasts differentiated with 50 μmol DMDC synthesized 1.1 times more calcium than MSCs incubated with other DMDC concentrations, and 1.3 times more than in control cultures ($p = 0.001$).

Conclusion. Adding DMDC to the differentiation medium for EAT-MSCs from patients with coronary artery disease significantly enhances the synthesis of key markers of osteoblast differentiation. A particularly pronounced effect was observed at a concentration of 50 μmol of the drug.

Keywords: mesenchymal stem cells, N,N-dimethylimidicarboimide diamide, osteogenic differentiation, epicardial adipose tissue, vascular calcification, metformin

Received: 12.12.2025

Accepted: 04.05.2026

Published: 22.05.2026

For citation: Slesareva T.A., Gorbatovskaya E.E., Dyleva Yu.A., Dolmatova S.E., Fanaskova E.V., Dvadtsatyov I.V., Gusev S.M., Gruzdeva O.V. Effect of N,N-dimethylimidedicarboimide diamide (metformin hydrochloride) on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells of epicardial adipose tissue. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(2): 108-117. doi: 10.29413/ABS.2026-11.2.11

ОБОСНОВАНИЕ

В России, как и во всем мире, несмотря на проводимые лечебно-профилактические мероприятия, сердечно-сосудистая патология по-прежнему занимает первое место в структуре заболеваемости и смертности. По данным Росстата, число умерших от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) россиян в 2023 году составило 46 % от всех случаев смерти. Из них на ишемическую болезнь сердца (ИБС) приходилось больше половины – 52 % [1].

Значимой патологией, осложняющей течение ИБС, является кальцификация коронарных артерий (ККА). Известно, что практически треть пациентов, получающих оперативное лечение, направленное на реваскуляризацию миокарда, имеют выраженный кальциоз артерий сердца [2]. По данным большинства авторов, в возрастной категории старше 70 лет ККА встречается более чем у 90 % мужчин и более чем у 67 % женщин [3]. ККА приводит к снижению податливости сосудов, аномальным вазомоторным реакциям и нарушению перфузии миокарда и, как следствие, к ухудшению течения и увеличению риска неблагоприятных исходов ИБС [4].

На сегодняшний день специфических способов профилактики и лечения развития ККА не существует. Однако данные литературы показывают, что прием некоторых лекарственных средств пациентами с ИБС значительно снижает частоту развития тяжелого кальциоза сосудов сердца [5]. Так, показано, что N,N-диметилмиддикарбоимид диамид (метформина гидрохлорид) (ДМКД) демонстрирует потенциал для управления остеогенной дифференцировкой мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и может играть роль в профилактике кальцификации коронарных артерий [5-7]. Это может быть обусловлено как плейотропными, противовоспалительными, антиоксидантными свойствами препарата, его способностью влиять на липидный обмен, так и непосредственным взаимодействием с клетками-предшественниками остеобластов, локализующихся в сердечно-сосудистой системе (ССС) и участвующих в формировании кальцинированной бляшки. Имеются исследования, показывающие, что ДМКД подавляет экспрессию основных ключевых остеогенных транскрипционных факторов в гладкомышечных клетках сосудов [8]. На основании этих данных была выдвинута гипотеза о возможности модуляции процессов кальцификации коронарных сосудов посредством влияния разных концентраций ДМКД на остеогенную дифференцировку мультипотентных клеток, резидентно присутствующих с ССС.

Мультипотентные клетки в сердечно-сосудистой системе присутствуют в составе стромально-васкулярной фракции эпикардальной жировой ткани (ЭЖТ) – МСК. Данные литературы свидетельствуют о том, что МСК из ЭЖТ способны мигрировать в зону повреждения сосуда и способствовать восстановлению посредством дифференцировки в гладкомышечные клетки и перициты, а также оказывать паракринный эффект [9]. K. Boström et al. показали, что в пораженных

атеросклерозом артериях присутствуют МСК [10]. Однако, являясь мультипотентными, МСК способны к дифференцировке еще как минимум в трех ортодоксальных направлениях, включая остеогенное, в зависимости от воздействующих на них внешних факторов [11]. Ранее нами было показано, что МСК, полученные из ЭЖТ пациента с ИБС, способны к дифференцировке в остеобласты и экспрессируют остеогенные гены даже при культивировании в среде, не содержащей остеоиндукторы [12].

Эти и другие исследования показывают, что МСК ЭЖТ являются источниками остеобластов в сердечно-сосудистой системе и участвуют в формировании кальцифицированной бляшки. Возможность модулирования остеогенной дифференцировки МСК ЭЖТ может стать таргетной мишенью для фармакокоррекции ККА. Для того, чтобы определить возможность управления остеогенной дифференцировкой МСК ЭЖТ посредством воздействия фармакологических препаратов, мы исследовали влияние разных концентраций ДМКД на остеогенную дифференцировку МСК ЭЖТ.

Таким образом, **целью данного исследования** являлось оценить влияние разных концентраций ДМКД на остеогенную дифференцировку МСК ЭЖТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Жировая ткань была получена от пациентов с ИБС (20 образцов от разных пациентов) во время открытой операции на сердце прямой реваскуляризации миокарда методом коронарного шунтирования (КШ). Этапы исследования, предусматривающие непосредственное участие пациентов, были выполнены в соответствии с этическими стандартами Национального комитета по исследовательской этике, а также с положениями Хельсинкской декларации 1964 года и последующих редакций. Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НИИ КПССЗ (протокол № 12 от 13.03.2025). От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Средний возраст пациентов составлял 63 ± 5 года. ЭЖТ получали из левых отделов сердца зоны ее наибольшего присутствия в количестве 3–5 г. Методика выделения МСК из ЖТ описана нами ранее [13].

Культивирование клеток с ДМКД

Для исследования влияния ДМКД на МСК ЭЖТ использовали Metformin hydrochloride (Sigma-Aldrich, США), в разведении с остеогенной средой (MSCgo™ Osteogenic Differentiation Medium, Sartorius, Германия) для культивирования МСК. Среда с ДМКД приготавливалась непосредственно перед использованием. На основании данных литературы, экспериментальными концентрациями препарата были определены 10 мкмоль, 50 мкмоль, 100 мкмоль.

Иммунофенотипирование клеток (проточная цитометрия)

Для исследования уровня экспрессии поверхностных антигенов использовались клетки 2-го, 3-го и 4-го

пассажа, культивирующиеся в базальной среде с добавлением ДМКД, в качестве контроля использовали клетки, культивирующиеся в среде без добавления ДМКД. В работе использовали следующие комбинации конъюгированных моноклональных антител и изотипических контролей к ним: FITC anti-human CD90 (Thy1) Antibody -328108 и FITC Mouse IgG1, к Isotype Ctrl (FC) Antibody – 400110; Pacific Blue™ anti-human CD45 Antibody — 304029 и Pacific Blue™ Mouse IgG1, к Isotype Ctrl Antibody – 400151; APC anti-human HLA-DR Antibody — 327022 и APC Mouse IgG2b, к Isotype Ctrl Antibody — 401210; PE anti-human CD105 Antibody — 323206 и PE Mouse IgG1, к Isotype Ctrl (FC) Antibody — 400114; APC/Cyanine7 anti-human CD73 (Ecto-5'-nucleotidase) Antibody -344022 и APC/Cyanine7 Mouse IgG1, к Isotype Ctrl Antibody — 400127. Окрашенные пробы ресуспендировали в PBS и анализировали на проточном лазерном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США) в программе CytExpert 2.1 (Beckman Coulter, США).

Остеогенная дифференцировка МСК

Для остеогенной дифференцировки клетки 3-го пассажа переносились в 24-луночный и в 6-ти луночные планшеты, предварительно покрытые фибронектином 10 мг/мл (ПанЭко, Россия) в количестве 1×10^4 /лунка и культивировались в базальной среде до достижения конfluence. Далее формировалось 4 экспериментальные культуры, культивирующиеся в остеогенной среде (MSCgo™ Osteogenic Differentiation Medium Sartorius, Германия) (контроль), остеогенной с добавлением 10 мкмоль ДМКД, остеогенной с добавлением 50 мкмоль ДМКД, остеогенной с добавлением 100 мкмоль ДМКД. Замену среды производили каждые 3 дня.

Имуноферментный анализ

Для получения супернатантов дифференцированных МСК клетки культивировались в 6-ти луночных планшетах. Перед проведением анализа культуры были предварительно лизированы для высвобождения внутриядерных и цитоплазматических белков, не секретируемых во внеклеточное пространство. Для этого каждая лунка промывалась 3 раза 1х PBS и обрабатывалась лизирующим буфером RIPA (Strong) (Servicebio Китай) в расчете 250 мкл/лунка в течении 5-ти минут. Далее производился сбор клеток, и инкубация на льду в течении 30 мин. Полученный лизат центрифугировался. Затем супернатант, содержащий белки, был отделен от клеточного дебриса и заморожен при -80°C до проведения анализа. Были исследованы уровень белковой экспрессии ALP (тканеспецифичная форма щелочной фосфатазы), RUNX2 (транскрипционный фактор RUNX), OPN (секретируемый фосфопротеин 1/остеопонтин) методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем Alkaline Phosphatase ELISA Kit, Human RUNX2 ELISA Kit, Osteopontin Human ELISA Kit фирмы FineTest (Китай) согласно протоколам производителей. Анализ проводился в 3-х повторях для каждого образца.

Окрашивание ализариновым красным и фотометрическое определение интенсивности кальцификации

Для подтверждения прошедшей остеогенной дифференцировки на 21-е сутки культивирования производили окрашивание культур ализариновым красным. Для этого клетки в 24-луночном планшете промывали PBS и добавляли 500 мкл 4 % параформальдегида на 30 минут. Далее после промывки PBS добавляли 500 мкл 2 % раствора ализаринового красного (Ленреактив, Россия) на 1 час с инкубацией в темноте. Далее каждая лунка однократно промывалась 1 мл PBS и результаты фиксировались микро- и макрофотографией. Затем для фотометрического определения интенсивности окрашивания в каждую лунку 24-луночного планшета с окрашенными клетками добавляли 250 мкл уксусной кислоты 10 % (Ленреактив, Россия). Надосадочную жидкость собирали в эпиндорф и добавляли 75 мкл 10 % гидроксида аммония (Alfa Aesar, Германия) и 100 мкл полученного раствора переносили в 96 планшет для последующего измерения оптической плотности на микропланшетном ридере в 3-х повторях (Erba LisaScan, Чехия) при длине волны 450 нм. Для определения концентрации ализаринового красного связавшегося с кальцием, строили калибровочный график путем измерения оптической плотности растворов ализаринового красного в концентрациях от 200 до 3,125 мкмоль/л.

Статистический анализ

Полученные данные собирались в базу с помощью Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Ричмонд, США). Статистическая обработка, графическое представление выполнено в программе GraphPad Prism 8 (Dotmatics, США). Данные представлены в виде медианы и 25% и 75% процентиля: Me [25%;75%]. Сравнение 3-х и более зависимых выборок производили с использованием непараметрического критерия Краскела – Уоллиса, значимыми считали скорректированные значения $p < 0,0125$. Для оценки различий количественных признаков при сравнении двух зависимых групп с отличным от нормального распределения был использован непараметрический U-тест Манна – Уитни. Критический уровень значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Популяция клеток, полученных из ЭЖТ и использованная в эксперименте, соответствовала критериям Международного общества клеточной терапии для МСК [14]. Мы получили адгезивные фибробластоподобные клетки, экспрессирующие специфические поверхностные маркеры CD73, CD90 и CD105, не экспрессирующие CD45, HLA-DR и способные дифференцироваться в остео- и адипогенном направлении (рис. 1).

Анализ влияния разных концентраций ДМКД на остеогенную активность МСК ЭЖТ пациентов с ИБС

Активность остеогенеза была оценена на 3-е, 7-е и 21-е сутки дифференцировки МСК ЭЖТ путем определения уровней остеогенных белков в супернатантах клеточных культур методом иммуноферментного анализа.

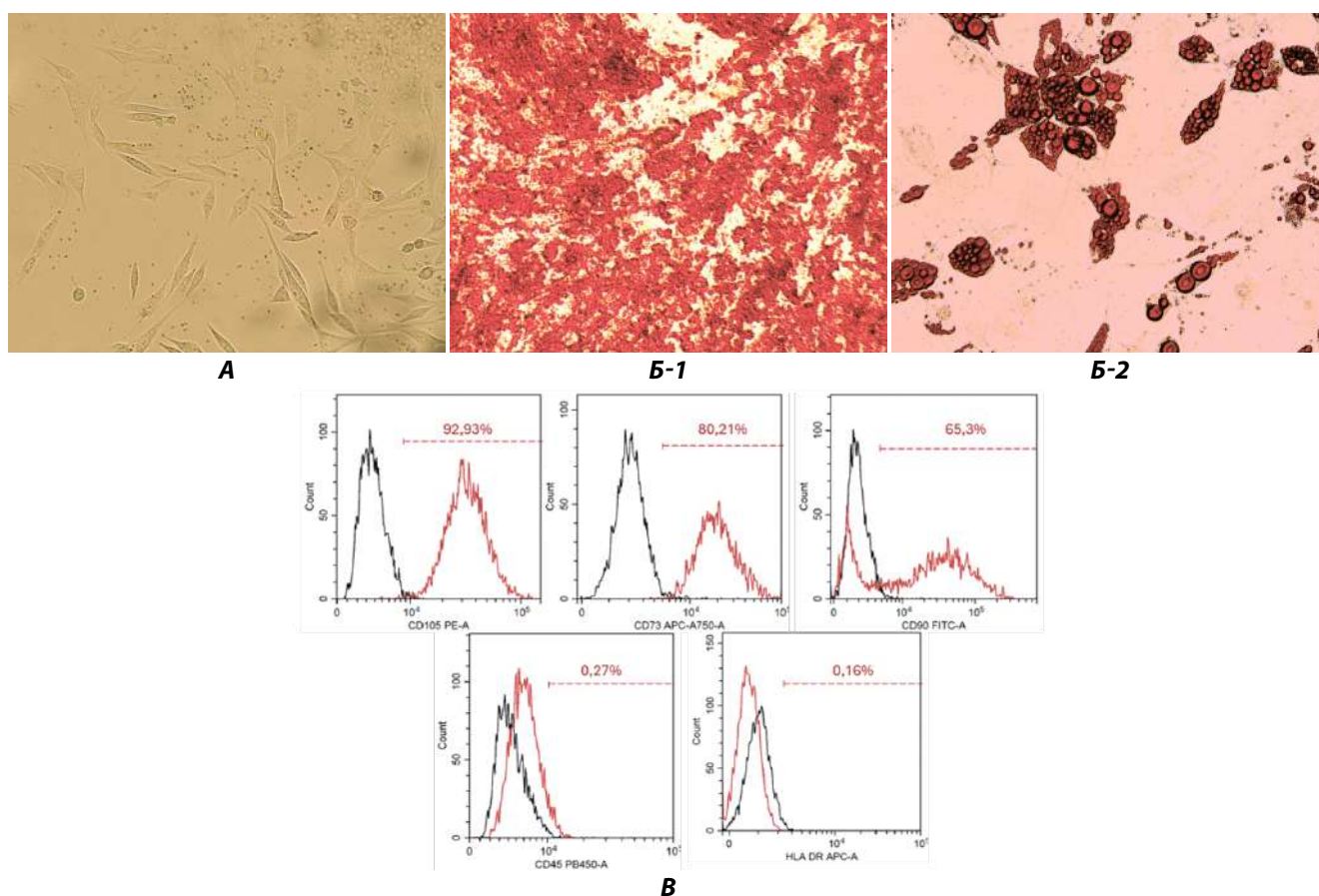


РИС. 1. Характеристика МСК ЭЖТ пациентов с ИБС: А) веретенообразная адгезивная культура клеток; Б-1) микрофотографии окрашивания ализариновым красным остеобластов, полученных из МСК; Б-2) микрофотографии окрашивания OilRed адипоцитов, полученных из МСК; В) Гистограммы, количество клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры

FIG. 1. Characteristics of EAT MSCs from patients with coronary heart disease: А) spindle-shaped adhesive cell culture; Б-1) micrographs of alizarin red staining of osteoblasts obtained from MSCs; Б-2) micrographs of OilRed staining of adipocytes obtained from MSCs; В) histograms, number of cells expressing surface markers

Было установлено, что добавление разных концентраций ДМКД в остеогенную среду изменяет уровень синтезируемых МСК остеогенных белков (рис. 2). Культивирование МСК с ДМКД в концентрации 50 мкмоль значительно увеличило уровень раннего маркера остеогенеза RUNX2 в супернатантах на 3-и и 15-е сутки культивирования ($p = 0,001$) в сравнении с контролем и другими концентрациями препарата. Однако к 21-м суткам изучаемые культуры МСК синтезировали RUNX2 в примерно одинаковом количестве.

Один из наиболее важных костных белков внеклеточного матрикса — остеопонтин синтезировался наиболее активно в МСК, культивирующихся с добавлением 50 мкмоль ДМКД ($p = 0,001$). Интересно, что уровень остеопонтина в супернатантах МСК, культивирующихся в среде с 10 и 100 мкмоль ДМКД, практически не различался. А клетки, не обработанные ДМКД, синтезировали остеопонтин в меньшем количестве по сравнению с клетками, культивируемыми с добавлением разных концентраций ДМКД, ($p = 0,001$). Уровень щелочной фосфатазы был максимальным также в супернатантах клеточных культур МСК, культивирующихся с добавлением 50 мкмоль ДМКД. На 3-и сутки дифференцировки

уровень ALPL в культуре с 50 мкмоль ДМКД был практически в 3 раза больше, чем в МСК, культивирующихся с 10 мкмоль ДМКД, и в 2 раза больше, чем в контроле. К 15-м и 21-м суткам клетки с 50 мкмоль ДМКД синтезировали ALPL активнее, чем другие культуры ($p = 0,001$).

Анализ влияния разных концентраций ДМКД на минерализацию внеклеточного матрикса остеобластами, полученными из МСК ЭЖТ пациентов с ИБС

При визуальной оценке минерализации внеклеточного матрикса ярких отличий в результатах окрашивания культур остеобластов, культивирующихся с разными концентрациями ДМКД и контролем, не обнаружено. Однако при фотометрическом определении установлено, что концентрация ализаринового красного, а, следовательно, количество кальция в культурах, культивирующихся с ДМКД, больше, чем в контрольной культуре. Кроме этого, достоверно установлено, что остеобласты, дифференцировавшиеся с добавлением 50 мкмоль ДМКД, синтезировали практически в 1,1 раза больше кальция во внеклеточное пространство по сравнению с МСК, инкубирующихся с другими концентрациями ДМКД, и в 1,3 раза больше, чем в контрольных культурах (рис. 3).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ДМКД, в концентрациях 10, 50, и 100 мкмоль, усиливает остеогенный потенциал МСК ЭЖТ пациентов с ИБС. Наиболее выраженный эффект наблюдается при культивировании клеток с добавлением 50 мкмоль препарата.

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день ДМКД, более известный как метформин гидрохлорид, является широко используемым препаратом для лечения сахарного диабета, в том числе и у пациентов с ИБС [15]. За более чем 60 лет использования этого препарата было установлено, что помимо своего основного класс-эффекта, он обладает множеством плейотропных воздействий [16]. На сегодняшний день доказано, что прием ДМКД ассоциируется со снижением тяжести сердечно-сосудистых заболеваний благодаря его влиянию на факторы риска, такие как улучшение липидного профиля, нормализация артериального давления, противовоспалительные и антитромботические эффекты [17]. Исследования показывают снижение частоты инфаркта миокарда, смерти от ИБС и другие положительные эффекты у пациентов, принимающих ДМКД [18]. Кроме этого, установлена корреляция между приемом ДМКД и снижением частоты встречаемости ККА – патологического состояния, значительно усугубляющего течение ИБС и ухудшающего прогноз оперативного лечения пациентов с нарушением кровоснабжения миокарда [5]. Антикацифицирующий эффект ДМКД в сердечно-сосудистой системе может опосредоваться как его противовоспалительным и антиатерогенным действием, так и взаимодействием с мультипотентными клетками, которые опосредуют образование кальцината в стенке сосуда посредством дифференцировки в остеобласты [19-21].

Мы исследовали влияние разных концентраций ДМКД на мультипотентные клетки в ССС – МСК ЭЖТ и получили результаты, свидетельствующие о том, что *in vitro* воздействие препарата на данные клетки способно усиливать их остеогенный потенциал. Это выражалось и в увеличении синтеза специфических костных белков клетками и в повышении эффективности синтеза кальция во время и после дифференцировки МСК в остеобласты. Это согласуется с уже имеющимися результатами исследований с МСК других локализаций. Так, Zhao X. et al. показали, что добавление ДМКД в диапазоне концентраций 10–200 мкмоль значительно увеличивало экспрессию остеогенных генов, активность щелочной фосфатазы, минерализацию матрикса в МСК, полученных из молочных зубов [22]. Lei T. et al. установили, что культивирование МСК пуповинной связки с добавлением от 1-го до 1000 мкмоль ДМКД приводило к увеличению экспрессии остеогенных генов *ALP*, *OCN* и *RUNX2* и снижению экспрессии адипогенных генов *PPAR γ* [23]. Приведенные выше исследования демонстрировали дозозависимый эффект ДМКД на остеогенную дифференцировку МСК. Мы же получили

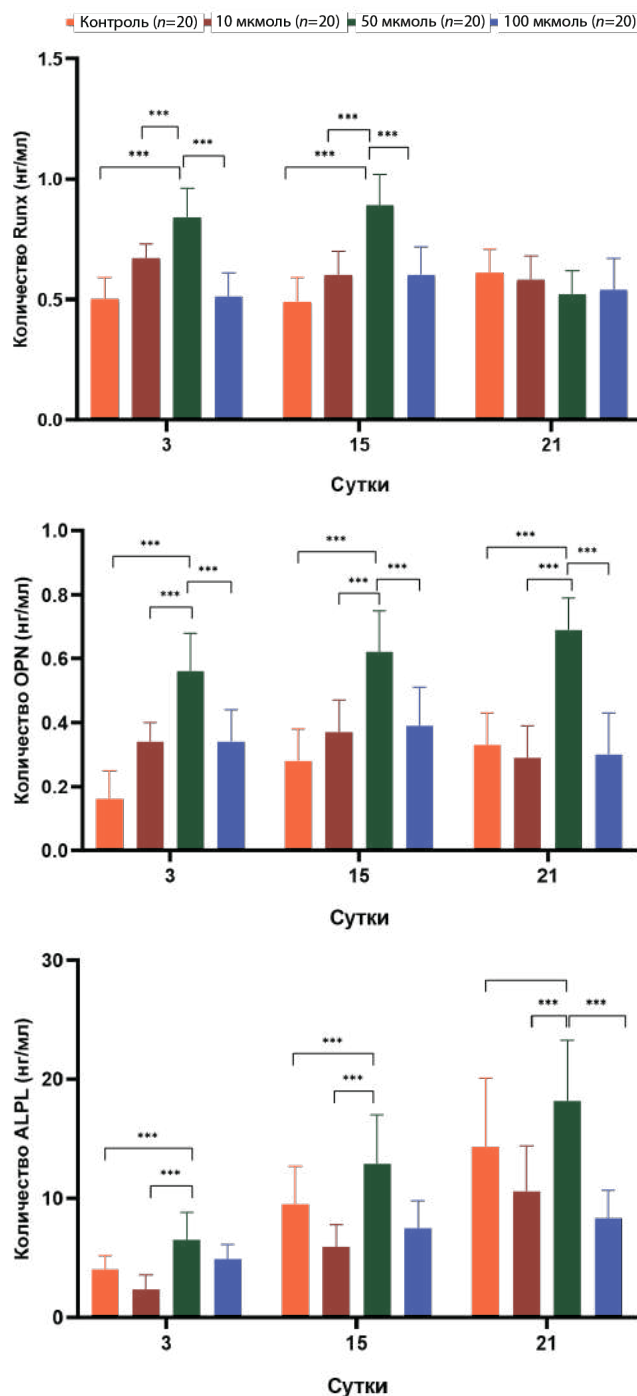


РИС. 2. Уровень остеогенных белков в супернатантах МСК ЭЖТ пациентов с ИБС, культивирующихся с разными концентрациями ДМКД

Примечания: *RUNX2* (транскрипционный фактор *RUNX*), *OPN* (секретируемый фосфопротеин 1/остеоонтин), *ALP* (тканенеспецифичная форма щелочной фосфатазы) «***» – $p = 0,001$, «**» – $p = 0,01$, n – количество пациентов.

FIG. 2. Level of osteogenic proteins in supernatants of EAT-MSCs from patients with coronary heart disease, cultured with different concentrations of DMDC

Note. *RUNX2* (transcription factor *RUNX*), *OPN* (secreted phosphoprotein 1/osteopontin), *ALP* (tissue-non-specific form of alkaline phosphatase) «***» – $p = 0.001$, «**» – $p = 0.01$, n – number of patients.

нелинейную зависимость эффекта от дозы концентрации ДМКД: 10 и 100 мкмоль не вызвали значимого увеличения синтеза костных белков в клетках по сравнению с контролем, тогда как добавление 50 мкмоль препарата привело к интенсификации остеогенеза

в культурах. Это может объясняться в первую очередь локализацией МСК – данное исследование сосредоточено на ЭЖТ пациентов с ИБС, в то время как приведенные выше исследования направлены на изучение МСК молочных зубов и пуповины. Во-вторых, наше

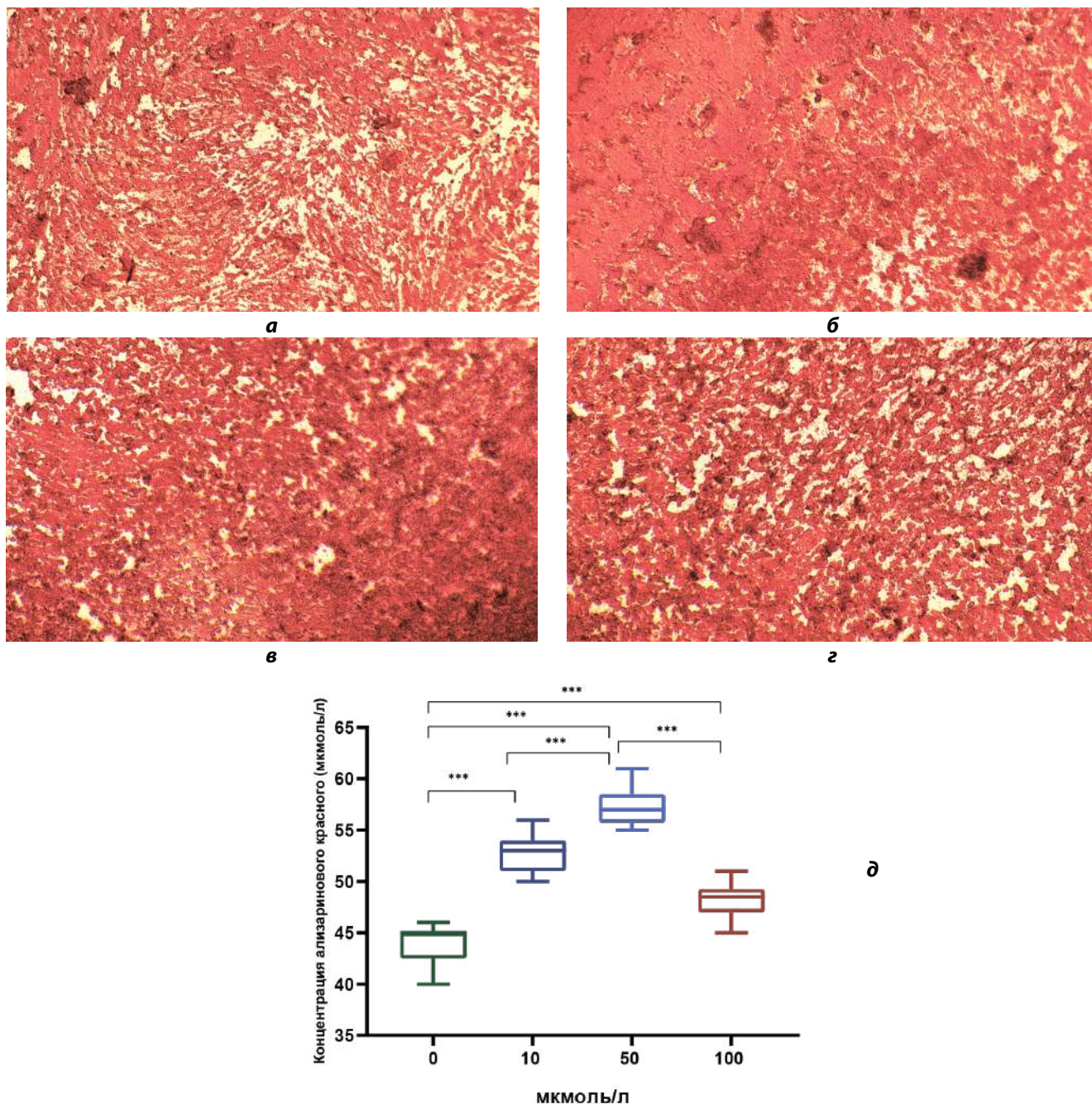


РИС. 3. Микро- и макрофотографии окрашивания ализариновым красным остеобластов, полученных из МСК ЭЖТ пациентов с ИБС, и количественное измерение интенсивности окрашивания культур
Примечание: а) МСК с добавлением 10 мкмоль ДМКД, б) МСК с добавлением 50 мкмоль ДМКД, в) МСК с добавлением 100 мкмоль ДМКД, г) МСК без добавления ДМКД (контроль), д) фотометрическое измерение концентрации ализаринового красной, связанного с кальцием, синтезированным остеобластами, «***» – $p = 0,001$.

FIG. 3. Micro- and macrophotographs of alizarin red staining of osteoblasts obtained from EAT MSCs of patients with coronary heart disease and quantitative measurement of the staining intensity of the cultures
Note. а) MSCs with the addition of 10 μmol DMDC, б) MSCs with the addition of 50 μmol DMDC, в) MSCs with the addition of 100 μmol DMDC, г) MSCs without the addition of DMDC (control), д) photometric measurement of the concentration of alizarin red bound to calcium synthesized by osteoblasts, “***” – $p = 0.001$.

исследование сосредоточено на донорах старшего возраста, имеющих заболевания сердца, в то время как Zhao X. et al, Lei T. et al. изучали клетки доноров детского возраста и формирующихся внутриутробно.

Ключевой фактор транскрипции, определяющий дифференцировку МСК в остеобласты и являющийся критически важным для ранних стадий остеогенеза, – белок RUNX2 [24] синтезировался в МСК ЭЖТ на протяжении всей дифференцировки. Установлено, что добавление 50 мкмоль ДМКД к МСК ЭЖТ пациентов с ИБС значительно усилило синтез данного маркера в клетках. Существующие на сегодня исследования по влиянию ДМКД на экспрессию и синтез RUNX2 противоречивы. Одни работы свидетельствуют о том, что в гладкомышечных сосудах клеток и интерстициальных клетках аортального клапана ДМКД вызывает снижение экспрессии данного гена и синтеза соответствующего белка, другие – в костной ткани ДМКД усиливает остеогенез посредством повышения активности RUNX2 [25-27]. Также мы оценили влияние ДМКД на синтез остеопонтина МСК ЭЖТ во время остеобластной дифференцировки. Остеопонтин — это гликопротеин внеклеточного матрикса, широко распространённый в костной ткани и других видах соединительной ткани. Он играет важную роль в регуляции остеогенеза, ремоделировании костей, межклеточного взаимодействия [28]. Синтез остеопонтина остеобластами начинается еще на ранних стадиях созревания и сохраняется на протяжении всей жизни клетки [29]. Мы увидели, что добавление разных концентраций ДМКД в среду для дифференцировки МСК значимо увеличило синтез данного белка клетками по сравнению с контролем уже на 3-и сутки. Однако к 21-м суткам дифференцировки его уровень в МСК, культивирующихся с 10 и 100 мкмоль ДМКД, стал не отличимым от контрольных клеток. Интересно, что добавление 50 мкмоль препарата в среду для МСК привело к значительной активации синтеза остеопонтина в них, которая сохранялась на протяжении всей дифференцировки. Аналогичные данные были получены и в результате исследования щелочной фосфатазы, она играет ключевую роль в костной минерализации и является важным маркером активности остеобластов [30]. Количество щелочной фосфатазы, синтезируемой исследуемыми нами МСК, увеличивалось в период их дифференцировки и стало максимальным по превращению их в остеобласты, т.е. на 21-е сутки. Установлено, что в конце эксперимента остеобласты, которые дифференцировались в присутствии 50 мкмоль ДМКД, активнее синтезировали щелочную фосфатазу по сравнению с контролем и остеобластами, созревающими при 10 и 100 мкмоль препарата. Созревание остеобластов в исследуемых культурах также было подтверждено анализом минерализации внеклеточного матрикса. Измерение интенсивности окрашивания ализариновым красным показало, что отложение соединений кальция наблюдалось во всех культурах. Тем не менее, наибольшее количество красителя, связавшегося с кальцием, было отмечено в остеобластах, обработанных ДМКД в концентрации 50 мкмоль. Феномен, при

котором 50 мкмоль ДМКД вызывает более сильную остеогенную дифференцировку, чем 10 и 100 мкмоль, вероятно, связан с достижением оптимальной концентрации для активации ключевых путей дифференцировки без возникновения токсичных или ингибирующих эффектов. Это подчеркивает важность точной дозировки при использовании ДМКД для регуляции клеточных процессов. По всей видимости, для МСК ЭЖТ концентрация ДМКД более 100 мкмоль является токсичной или частично ингибирующей жизнедеятельность. Необходимы дополнительные исследования данного феномена для понимания возможностей применения ДМКД в коррекции ККА.

ВЫВОД

В ходе проведенного исследования выявлено, что добавление ДМКД в среды для дифференцировки МСК из ЭЖТ пациента с ИБС значительно усиливает синтез ключевых маркеров остеобластной дифференцировки, таких как RUNX2, остеопонтин и щелочная фосфатаза. Особенно выраженное влияние было отмечено при концентрации 50 мкмоль препарата, которая способствовала повышенной активности этих маркеров и более интенсивной минерализации внеклеточного матрикса. Полученные результаты могут служить базой для дальнейших исследований в поиске таргетной терапии и профилактики ККА.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бойцов С.А. Состояние кардиологической помощи в субъектах Центрального, Уральского, Сибирского и Дальневосточного федеральных округов Российской Федерации. *Cardioweb.ru*. 2023. [Boytsov SA. Sustainable cardiological care for the subjects of the Central, Ural, Siberian and Far Eastern Federal Districts of the Russian Federation. *Cardioweb.ru*. 2023. (In Russ.). URL: <https://cardioweb.ru/files/glavny-kardiolog/2023/Boytsov> [date of access: 02.11.2025].
2. Bourantas CV, Zhang YJ, Garg S, Mack M, Dawkins KD, Kappetein AP, et al. Prognostic implications of severe coronary calcification in patients undergoing coronary artery bypass surgery: an analysis of the SYNTAX study. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2015; 85(2): 199- 206. doi: 10.1002/ccd.25545
3. Майоров Г.Б., Курбанов С.К., Власова Э.Е., Галютдинов Д.М., Васильев В.П., Ширяев А.А. и др. Проблема кальциноза при коронарной болезни сердца: вопросы диагностики, прогноза и выбора лечения. *Кардиологический вестник*. 2018; 13(4): 4-10. [Mayorov GB, Kurbanov SK, Vlasova EE, Galyautdinov DM, Vasiliev VP, Shiryayev AA, et al. Calcification in coronary heart disease:

- issues of diagnosis, prognosis and choice of treatment. *Russian Cardiology Bulletin*. 2018; 13(4): 4-10. (In Russ.]. doi: 10.17116/Cardiobulletin2018130414
4. Liu W, Zhang Y, Yu CM, Ji QW, Cai M, Zhao YX, et al. Current understanding of coronary artery calcification. *J Geriatr Cardiol*. 2015; 12(6): 668-75. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2015.06.012
 5. Lu Y, Wang Y, Weng T, Chen Z, Sun X, Wei J, et al. Association between Metformin Use and Coronary Artery Calcification in Type 2 Diabetic Patients. *J Diabetes Res*. 2019; 2019: 9484717. doi: 10.1155/2019/9484717
 6. Smieszek A, Tomaszewski KA, Kornicka K, Marycz K. Metformin promotes osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells and exerts pro-osteogenic effect stimulating bone regeneration. *J Clin Med*. 2018; 7(12): 482. doi: 10.3390/jcm7120482
 7. Cao X, Li H, Tao H, Wu N, Yu L, et al. Metformin inhibits vascular calcification in female rat aortic smooth muscle cells via the AMPK-eNOS-NO pathway. *Endocrinology*. 2013; 154(10): 3680-9. doi: 10.1210/en.2013-1002
 8. Phadwal K, Koo E, Jones RA, Forsythe RO, Tang K, et al. Metformin protects against vascular calcification through the selective degradation of Runx2 by the p62 autophagy receptor. *J Cell Physiol*. 2022; 237(11): 4303-4316. doi: 10.1002/jcp.30887
 9. Rao KS, Spees JL. Harnessing Epicardial Progenitor Cells and Their Derivatives for Rescue and Repair of Cardiac Tissue After Myocardial Infarction. *Curr Mol Biol Rep*. 2017; 3(3): 149-158. doi: 10.1007/s40610-017-0066-6
 10. Boström KI, Yao J, Guihard PJ, Blazquez-Medela AM, Yao Y. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerotic lesion calcification. *Atherosclerosis*. 2016; 253: 124-127. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.046
 11. Kostina A, Lobov A, Semenova D, Kiselev A, Klausen P, Malashicheva A. Context-Specific Osteogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Biomedicines*. 2021; 9(6): 673. doi: 10.3390/biomedicines9060673
 12. Учасова Е.Г., Дылева Ю.А., Слесарева Т.А., Белик Е.В., Понасенко А.В., Великанова Е.А. и др. Остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток эпикардальной жировой ткани у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Бюллетень сибирской медицины*. 2025; 24(1): 86-95. [Uchasova EG, Dyleva YuA, Slesareva TA, Belik EV, Ponasenko AV, Velikanova EA, et al. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells of epicardial adipose tissue in patients with coronary heart disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2025; 24(1): 86-95. (In Russ.)]. doi: 10.20538/1682-0363-2025-1-86-95
 13. Слесарева Т.А., Учасова Е.Г., Дылева Ю.А., Горбатовская Е.Е., Белик Е.В., Матвеева В.Г. и др. Возрастные особенности иммунофенотипа мезенхимальных стволовых клеток периваскулярной жировой ткани у пациентов с пороками сердца. *Гены и Клетки*. 2025; 20(2): 141-151. [Slesareva TA, Uchasova EG, Dyleva YuA, Gorbатовskaya EE, Belik EV, Matveeva VG, et al. Age-related features of the immunophenotype of mesenchymal stem cells of perivascular adipose tissue in patients with heart defects. *Genes and Cells*. 2025; 20(2): 141-151. (In Russ.)]. doi: 10.17816/gc643445
 14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaughter-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7. doi: 10.1080/14653240600855905
 15. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011; 50(2): 81-98. doi: 10.2165/11534750-000000000-00000
 16. Turkistani A, Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Alexiou A, Papadakis M, et al. Pharmacological characterization of the antidiabetic drug metformin in atherosclerosis inhibition: A comprehensive insight. *Immun Inflamm Dis*. 2024; 12(8): e1346. doi: 10.1002/iid3.1346
 17. Davidsen L, Jensen MH, Cook ME, Vestergaard P, Knop FK, et al. Metformin treatment is associated with reduced risk of hypoglycaemia, major adverse cardiovascular events, and all-cause mortality in patients with post-pancreatitis diabetes mellitus: a nationwide cohort study. *Eur J Endocrinol*. 2024; 190(1): 44-53. doi: 10.1093/ejendo/lvad175
 18. Bu Y, Peng M, Tang X, Xu X, Wu Y, Chen AF, et al. Protective effects of metformin in various cardiovascular diseases: Clinical evidence and AMPK-dependent mechanisms. *J Cell Mol Med*. 2022; 26(19): 4886-4903. doi: 10.1111/jcmm.17519
 19. Scherthaner G, Brand K, Bailey CJ. Metformin and the heart: Update on mechanisms of cardiovascular protection with special reference to comorbid type 2 diabetes and heart failure. *Metabolism*. 2022; 130: 155160. doi: 10.1016/j.metabol.2022.155160
 20. Qiu X, Xu Q, Xu T, Wan P, Sheng Z, Han Y, et al. Metformin alleviates β -glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells via AMPK/mTOR-activated autophagy. *Exp Ther Med*. 2021; 21(1): 58. doi: 10.3892/etm.2020.9490
 21. Deng M, Su D, Xu S, Little PJ, Feng X, Tang L, et al. Metformin and Vascular Diseases: A Focused Review on Smooth Muscle Cell Function. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 635. doi: 10.3389/fphar.2020.00635
 22. Zhao X, Pathak JL, Huang W, Zhu C, Li Y, Guan H, et al. Metformin enhances osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth through AMPK pathway. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020; 14(12): 1869-1879. doi: 10.1002/term.3142
 23. Lei T, Deng S, Chen P, Xiao Z, Cai S, Hang Z, et al. Metformin enhances the osteogenesis and angiogenesis of human umbilical cord mesenchymal stem cells for tissue regeneration engineering. *Int J Biochem Cell Biol*. 2021; 141: 106086. doi: 10.1016/j.biocel.2021.106086
 24. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 658: 43-9. doi: 10.1007/978-1-4419-1050-9_5
 25. Phadwal K, Koo E, Jones RA, Forsythe RO, Tang K, Tang Q, et al. Metformin protects against vascular calcification through the selective degradation of Runx2 by the p62 autophagy receptor. *J Cell Physiol*. 2022; 237(11): 4303-4316. doi: 10.1002/jcp.30887

26. Phadwal K, Tan X, Koo E, Zhu D, MacRae VE. Metformin ameliorates valve interstitial cell calcification by promoting autophagic flux. *Sci Rep.* 2023; 13: 21435. doi: 10.1038/s41598-023-47774-6
27. Liang G, Feng Y, Jiang Y, Qu F. The Potential Therapeutic Role of Metformin in Diabetic and Non-Diabetic Bone Impairment. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022; 15(10): 1274. doi: 10.3390/ph15101274
28. Si J, Wang C, Zhang D, Wang B, Zhou Y. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Med Sci Monit.* 2020; 26: e919159. doi: 10.12659/MSM.919159
29. Malaval L, Follet H, Farlay D, Gineyts E, Rizzo S, Thomas C, et al. OPN, BSP, and Bone Quality-Structural, Biochemical, and Biomechanical Assessment in OPN-/-, BSP-/-, and DKO Mice. *Calcif Tissue Int.* 2024; 115(1): 63-77. doi: 10.1007/s00223-024-01217-0
30. Seung Min. The Role of Alkaline Phosphatase in Bone Mineralization: Mechanisms and Clinical Implications. *Bioceram Dev App.* 2024; 14(2): 257. doi: 10.37421/2090-5025.2024.14.257

Сведения об авторах

Слесарева Тамара Александровна – научный сотрудник лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; аспирант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»; e-mail: soloveva081296@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0749-4093>

Горбатовская Евгения Евгеньевна – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; старший преподаватель кафедры медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»; e-mail: eugenia.tarasowa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0500-2449>

Дылева Юлия Александровна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории исследования гомеостаза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; e-mail: eugenia.tarasowa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6890-3287>

Софья Евгеньевна Долматова – лаборант-исследователь лаборатории исследований гомеостаза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; ассистент кафедры медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»; e-mail: soniad_30_09@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0008-2997-4497>

Фанаскова Елена Викторовна – кандидат медицинских наук, врач-трансфузиолог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; e-mail: fanaev@kemcardio.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2705-3252>

Двадцатов Иван Викторович – кандидат медицинских наук, врач сердечно-сосудистый хирург ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; e-mail: halivopulo@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2243-1621>

Гусев Сергей Михайлович – врач сердечно-сосудистый хирург ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; e-mail: gusesm@kemcardio.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7668-6411>

Груздева Ольга Викторовна – доктор медицинских наук, профессор, профессор РАН, заведующая лабораторией исследований гомеостаза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; заведующая кафедрой медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»; email: o_gruzdeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7780-829X>

Information about the authors

Tamara A. Slesareva – researcher at the Homeostasis Research Laboratory of the Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; postgraduate student of the Department of Pathological Physiology, Kemerovo State Medical University; e-mail: soloveva081296@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0749-4093>

Evgeniya E. Gorbatskovskaya – Cand. Sc. (Med), junior researcher at the Homeostasis Research Laboratory of the Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; senior lecturer of the Department of Medical Biochemistry, Kemerovo State Medical University; e-mail: eugenia.tarasowa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0500-2449>

Yulia A. Dyleva – Cand. Sc. (Med), senior researcher at the Homeostasis Research Laboratory of the Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; e-mail: eugenia.tarasowa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6890-3287>

Sofia E. Dolmatova – laboratory assistant at the Laboratory of Homeostasis, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases; assistant of the Department of Medical Biochemistry, Kemerovo State Medical University; e-mail: soniad_30_09@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0008-2997-4497>

Elena V. Fanaskova – Cand. Sc. (Med), transfusion physician, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; e-mail: fanaev@kemcardio.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2705-3252>

Ivan V. Dvadtsatov – Cand. Sc. (Med), cardiovascular surgeon, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; e-mail: halivopulo@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2243-1621>

Sergey M. Gusev – cardiovascular surgeon, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; e-mail: gusesm@kemcardio.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7668-6411>

Olgav. Gruzdeva – Dr. Sc. (Med.), professor, professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Homeostasis Research Laboratory of the Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Head of the Department of Medical Biochemistry, Kemerovo State Medical University; e-mail: o_gruzdeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7780-829X>