

Мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани взрослого человека: дифференцировочные свойства и потенциал для низкотемпературного консервирования

Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells: Differentiation Capacities and Potential for Low Temperature Preservation

YU.A. PETRENKO

Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Жировая ткань (ЖТ) взрослого человека представляет собой доступный альтернативный источник мезенхимальных стромальных клеток (МСК) для регенеративной медицины и тканевой инженерии.

Цель работы – оценить морфологические особенности, иммунофенотип и способность МСК ЖТ к направленной дифференцировке *in vitro* в различных мезенхимальных и немезенхимальных направлениях.

Жировую ткань человека получали в результате липосакции после письменного согласия проинформированного донора. МСК ЖТ выделяли и культивировали как описано нами ранее (Петренко А.Ю. и соавт., 2008). Иммунофенотип МСК ЖТ определяли методами проточной цитометрии и иммуноцитохимии. Эффективность колониеобразования оценивали после 14 суток культивирования МСК ЖТ при посевной дозе 40 клеток/см². Адипогенную и остеогенную индукцию клеток проводили путем культивирования в течение 21 суток в средах, содержащих специфические факторы дифференцировки. Эндотелиальный потенциал клеток на различных этапах культивирования определяли при посеве клеток во внеклеточный матрикс Matrigel в среде, содержащей специфические факторы эндотелиальной дифференцировки. Дифференцировку МСК ЖТ в инсулин-продуцирующие клетки проводили при культивировании в течение 3 недель в среде с высоким (25 мМ) содержанием глюкозы в присутствии или при отсутствии экстрактов поджелудочной железы.

Было отмечено, что эффективность колониеобразования МСК ЖТ составляла около 8%. При дифференцировке поликлональных культур МСК ЖТ в адипогенном и остеогенном направлениях отмечено, что около 50% всех колоний состояли или включали клетки, дифференцированные в приведенных направлениях. Оценен остеогенный и адипогенный потенциал общей культуры МСК ЖТ на различных этапах культивирования. При оценке эндотелиального потенциала было выявлено, что МСК ЖТ на различных этапах культивирования способны к образованию капиллярноподобных структур в специфическом внеклеточном матриксе. Направленная дифференцировка МСК ЖТ в инсулин-продуцирующие клетки приводила к изменению морфологии клеток, а также образованию агрегатов, напоминающих кластеры. При этом клетки, находящиеся как в монослое, так и в агрегатах, позитивно окрашивались дитизоном, а также моноклональными антителами на инсулин и проинсулин.

Таким образом, создание низкотемпературных банков МСК ЖТ взрослого человека является перспективным для регенеративной медицины и тканевой инженерии за счет уникального мультилинейного потенциала данных клеток.

Human adult adipose tissue (AT) is accessible alternative source of mesenchymal stromal cells (MSCs) for regenerative medicine and tissue engineering.

The aim of this study was to assess the morphological properties, immunophenotype and ability of AT MSCs for *in vitro* differentiation into different mesenchymal and non-mesenchymal lineages.

Human AT was derived after liposuction procedure with the patient informed consent. AT MSCs were isolated and cultured as previously described (Petrenko A. Yu. *et al.* 2008). Immunophenotype of AT MSCs was determined by flow cytometry and immunocytochemistry. Clonogenic efficiency was assessed after 14 days of culture with the plating density 40 cells per cm². Adipogenic and osteogenic differentiation of cells was prepared by 21 days of culture in media, supplemented with specific induction factors. Endothelial potential of MSC at different stages of culture was assessed after plating of cells into extracellular matrix Matrigel in media, supplemented with specific factors of endothelial differentiation. Differentiation of AT MSCs into insulin-producing cells was prepared during 3 weeks of culture in high (25 mM) glucose medium in the presence or absence of pancreatic extracts.

It was found that AT MSCs clonogenic efficiency comprised about 8%. Differentiation of polyclonal cultures of AT MSCs into adipogenic and osteogenic directions showed that about 50% of colonies were comprised or contained cells differentiated in described directions. The osteogenic and adipogenic potential of AT MSC at different stages of culture was also assessed. AT MSC at different stages of cultivation were able to form capillary-like structures in extra-cellular matrix confirming the endothelial differentiation potential of cells. Induced differentiation of AT MSC into insulin-producing cells resulted in the change of cell morphology as well as formation of cluster-like aggregates. Both cells in monolayer and in aggregates were positively stained by ditizone, as well as by monoclonal antibodies to insulin and proinsulin.

Therefore, the development of low temperature banks of human adult AT MSC is perspective for regenerative medicine and tissue engineering due to unique multilineage potential of these cells.