

Оригінальна стаття

УДК 611-013.395-018.26:591.81:616-092.9

Семенова В.М.¹, Лисяний Н.И.², Стайно Л.П.¹, Бельская Л.Н.², Егорова Д.М.¹

¹Лаборатория культивирования тканей, Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

²Отдел нейроиммунологии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

Пролиферативный и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в условиях культивирования

Цель. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани (ЖТ) экспериментальных животных и человека для изучения индукции нейрогенной дифференцировки.

Материалы и методы. Для культивирования МСК использована ЖТ от 30 животных и 5 пациентов. Культуры МСК исследованы в течение 5 пассажей. Для индукции нейрогенной дифференцировки использованы ретиноевая кислота (1 мкмоль) или/и 5-азациитидин (1 мкмоль). Культуры изучены прижизненно, а также по данным цитологического и иммуногистохимического исследований.

Результаты. В культурах клеток из ЖТ отмечен рост фибробластоподобных МСК. В присутствии факторов специфической дифференцировки они приобретают нейроноподобный и астроцитоподобный фенотип с позитивной реакцией на GFAP.

Выводы. При культивировании клеток из ЖТ экспериментальных животных и человека получена фракция МСК, способных к индукции нейрогенной дифференцировки под влиянием ретиноевой кислоты и/или 5-азациитидина, что подтверждается данными иммуногистохимических исследований.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, культура, нейроглиальная дифференцировка.

Укр. нейрохірург. журн. — 2014. — №3. — С. 24-29.

Поступила в редакцию 05.03.14. Принята к публикации 25.04.14.

Адрес для переписки: Семенова Вера Михайловна, Лаборатория культивирования тканей, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова, ул. Платона Майбороды, 32, Киев, Украина, 04050, e-mail: seveme22@rambler.ru

Вступление. Современное состояние учения о биологии мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из различных тканей, позволяет надеяться на возможность их успешного использования в качестве объекта тканевой терапии в восстановительном лечении дегенеративных заболеваний ЦНС. В связи с этим активно обсуждается вопрос о биологических свойствах плюрипотентных аутологичных стволовых клеток (СК) стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани (ЖТ), содержащей мало дифференцированные клетки-предшественницы в соединительнотканых междольковых перегородках. Использование МСК ЖТ с предварительным дифференцированием их в нейральном направлении в условиях культивирования и их последующую алло- или аутотрансплантацию гистосовместимым пациентам считают одним из перспективных методов клеточной терапии при таких малокурабельных заболеваниях ЦНС, как деструкция межпозвоночных дисков, рассеянный склероз, травма спинного мозга, дегенеративное перерождение периферических нервов, болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, деменция, ДЦП, реакции «трансплантат против хозяина», опухоли мозга (глиобластома, нейробластома) и некоторых других [1, 2].

Преимуществом СКЖТ является доступность и безопасность выделения ЖТ в достаточном количестве практически у любого пациента, а также относительно несложная ферментная обработка для последующего культивирования в целях получения достаточного количества клеточного материала. В связи с этим ЖТ рассматривают как оптимальный ресурс для клеточной терапии, в том числе регенерации поврежденной нервной ткани. Установлено, что использование аутологичных культивируемых МСК, дифференцированных в нейральном направлении, оказывает положительное влияние на скорость улучшения функции мышц, обеспечивает восстановление функций органов таза и уменьшение спастичности даже у больных при старой спинальной травме с полным анатомическим повреждением спинного мозга. При этом раннее применение такого способа в условиях частичного сохранения целостности проводящих путей значительно повышает эффективность лечения [3, 4].

При введении МСК из ЖТ человека в боковой желудочек мозга крысы через 1 сут после моделирования инсульта значительно улучшались поведенческие функции животного уже на 7-е сутки. По данным патоморфологического исследования поврежденных областей мозга установлена тропность миграции МСК

Статья содержит рисунки, которые отображаются в печатной версии — в оттенках серого, в электронной — в цвете.

к очагу поражения, а также выживание имплантированных в мозг клеток в течение не менее 30 сут [5].

На модели геморрагического инсульта у крыс показано, что после трансплантации МСК, полученных из ЖТ, у животных уменьшились неврологический дефицит и степень атрофии мозга [6].

Исследована также способность МСК из ЖТ восстанавливать нарушенные функции мозга крыс на модели хорей Гентингтона, индуцированной путем внутрибрюшинного введения 3-нитропропионовой кислоты. Этот нейротоксин вызывает стойкий окислительный стресс, гибель нейронов базальных ядер мозга, что обуславливает у подопытных животных когнитивные нарушения, сходные с таковыми при хорее Гентингтона у человека. При однократном внутривенном введении таким животным суспензии активированных мультипотентных МСК, полученных из ЖТ человека, заметно улучшалось состояние животных, уменьшалась выраженность неврологических симптомов, повышалась исследовательская активность и почти полностью восстанавливалась утраченная способность животных к обучению. По данным морфологического исследования пораженной ткани мозга обнаружено восстановление формы нейронов хвостатого ядра. По мнению авторов, эффективное лечение хорей Гентингтона у человека также возможно с помощью МСК, полученных из собственной ЖТ пациентов [7].

МСК из ЖТ могут активировать пролиферацию клеток и микроциркуляцию, обеспечивая существенное уменьшение зоны ишемического инфаркта мозга [8]. Предполагают, что этот процесс осуществляется вследствие активации синтеза IL-8, SDF-1, фактора ингибции апоптоза Bcl-2, фактора фон Виллебранда и даблкортина.

На модели аутоиммунного энцефаломиелита показана миграция МСК из ЖТ в демиелинизированные участки мозга, что сопровождается увеличением количества эндогенных олигодендроцитов [9]. Предполагают, что нейропротекторные свойства МСК из ЖТ реализуются паракринно за счет трофических факторов и активации клеток реципиента. Кондиционированная среда от МСК защищает культуру гранулярных нейронов мозжечка от индуцированного апоптоза путем активации каспазы-3 [10].

В настоящее время актуальным направлением научных изысканий в области биологии МСК из ЖТ является разработка оптимальных методов выделения, идентификации и получения клонов стволовых и плюрипотентных клеток из ЖТ, а также совершенствование методов индукции их направленной дифференцировки в различные специализированные клетки, в частности, нейральные [11].

В настоящее время существуют несколько протоколов выделения и дифференцирования МСК из ЖТ в нейральном направлении. Большинство из них основаны на получении первоначально адгезивной фракции МСК, которые при последующем культивировании приобретают фибробластоподобный фенотип.

Приведенные данные литературы свидетельствуют о широких потенциальных возможностях использования МСК из ЖТ для клеточной терапии при различных заболеваниях нервной системы. В соответствии с протоколом B. Zavan [12], этап обогащения

СВФ МСК из ЖТ *in vitro* должен быть направлен на накопление в условиях культивирования как можно большего количества нейропрогениторов при меньшем числе пассажей [13].

Однако единого протокола получения и культивирования МСК из ЖТ нет. Необходимо совершенствование методов индукции их направленной дифференцировки в нейроглиальном направлении в целях последующего практического использования в клеточной терапии при различных заболеваниях ЦНС.

Целью исследования является: отработка оптимального метода получения МСК, выделенных из ЖТ, полученной от экспериментальных животных и человека; обеспечение оптимальных условий эффективного культивирования МСК из ЖТ; изучение условий индукции нейроглиальной дифференцировки МСК из ЖТ с применением известных индукторов (ретиноевой кислоты и 5-азациитидина).

Материалы и методы исследования. Для получения МСК из ЖТ использовали 30 экспериментальных животных: 18 крыс и 12 мышей. Использованы также фрагменты ЖТ 5 людей, полученные из мягких тканей спины во время нейрохирургических операций по поводу опухоли позвоночника и/или спинного мозга. Перед операцией получено информированное согласие больных на взятие фрагментов ЖТ в объеме 0,5 см³.

Методика выделения ЖТ у экспериментальных животных. Под наркозом операционное поле обрабатывали 96% раствором этанола в течение 5–10 мин. Стерильными ножницами вскрывали брюшную полость, из пахового участка выделяли ЖТ. Фрагменты ЖТ промывали несколько раз в свежих порциях раствора PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma) без Ca²⁺ и Mg²⁺.

Для получения МСК из ЖТ в условиях культивирования фрагменты ЖТ в стерильных условиях измельчали микроножницами, инкубировали в 0,075 % растворе коллагеназы (тип 1) в течение 60 мин при температуре 37°C, при постоянном помешивании. Фермент инактивировали путем добавления (1:1) среды DMEM (Sigma) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), клетки осаждали путем центрифугирования в течение 5–10 мин при скорости 1000 об./мин. Жидкую фазу со зрелыми жировыми клетками удаляли пипеткой Пастера, осадок ресуспендировали в среде роста (DMEM + 10% ЭТС). Выделяли мононуклеарные клетки путем центрифугирования в течение 30 мин при скорости 1000 об./мин в градиенте плотности Histopaque (Sigma). Полученную суспензию клеток отмывали дважды в среде роста путем центрифугирования в течение 10 мин при скорости 1000 об./мин, фильтровали через нейлоновый мешочек и после осаждения ресуспендировали в среде роста. Затем клетки помещали на дно пластиковых чашек Петри по 5–9×10⁶ клеток на 1 чашку. Осторожно без круговых движений распределяли суспензию равномерно по всей поверхности дна чашки Петри. Культуры содержали в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (95% влажности, 37°C). Для удаления неадгезированных элементов на следующие сутки питательную среду в культурах заменяли, добавляли факторы роста — 20 нг/мл bFGF (Sigma) и 20 нг/мл EGF (Sigma). В после-

дующем культуральную среду меняли через каждые 3–4 сут. Первый пассаж проводили при 50–70% конfluenceности монослоя (7–9-е сутки культивирования). Питательную среду заменяли 0,25% раствором трипсина, инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C, осаждали путем центрифугирования в течение 10 мин при скорости 1000 об./мин. Осадок ресуспендировали в среде роста и рассаживали по 1×10^6 клеток на чашку. Аналогичным способом получали второй и последующие пассажи (максимально 5). Для гистологического исследования часть клеток культивировали на адгезивных покровных стеклах, предварительно обработанных полиэтиленгликолем (Sigma).

Для индукции нейроглиального дифференцирования в культуры клеток 2-го пассажа добавляли специфические факторы нейрогенного дифференцирования: ретиноевую кислоту (1 мкмоль) и/или 5-азациитидин (1 мкмоль) как отдельно, так и в сочетании. Все культуры ежедневно прижизненно наблюдали с помощью инвертированного микроскопа Биолам П-3 (Россия) и Nikon Eclipse TS100 (Япония). Для цитологического исследования в разные сроки наблюдения культуры фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, окрашивали гематоксилином Караччи и тионином по Ниссю для выявления тонкой структуры нейроцитов, иммуногистохимически выявляли GFAP белок (глиальный маркер) по стандартной методике с помощью комплексного набора Mouse universal kit RNN34 (производства фирмы AMERSHAM, США).

Результаты и их обсуждение. По данным прижизненного наблюдения культивируемых МСК из ЖТ экспериментальных животных и человека в динамике роста в течение 3–5 пассажей, диссоциированные клетки, выделенные из СВФ ЖТ хорошо прикрепляются к пластиковому субстрату чашек Петри. При этом не адгезированные к пластику гемопозитические клетки постепенно десквамировались, а на дне чашек формировалась культура фибробластоподобных клеток МСК (**рис. 1**). На цитологических препаратах культивируемых МСК из ЖТ в диссоциированных культурах, независимо от источника получения ЖТ, преобладали мономорфные клетки округлой формы разного диаметра, среди них выявляли клетки биполярной формы с отростками.

При дальнейшем культивировании по мере увеличения плотности клеток монослоя в большинстве

из них появлялись четкие признаки конусообразного выпячивания полюса цитоплазмы и образования коротких отростков. После первого пассажа в сформированных колониях условно выделяли два типа стромальных клеток из ЖТ: увеличенные фибробластоподобные клетки с наличием филоподий и клетки с крупными ядрами, содержащими по 1–2 ядрышка с наличием вакуолей в цитоплазме. Кроме того, в зоне роста культур МСК наблюдали относительно мелкие клетки веретенообразной формы с четко выраженным ядром и короткими отростками.

В динамике пассирования культур МСК сохраняют приобретенные фенотипические особенности в течение 29–32 сут. Наблюдаемые нами фенотипические особенности клеточного состава культур, полученных из ЖТ, совпадают с описанными в литературе [14].

На 3–4-е сутки после добавления в среду роста культур МСК факторов нейрогенной дифференцировки — ретиноевой кислоты и/или 5-азациитидина как отдельно, так и в сочетании, в культурах МСК из ЖТ появлялись клетки с цитологическими признаками нейробластного фенотипа. Они приобретали веретенообразную и униполярную форму с образованием длинных отростков. Цитоплазматические тела некоторых нейроцитов приобретали звездчатую форму с наличием коротких цитоплазматических отростков, подобных дендритам.

В динамике наблюдения через 2 нед среди МСК из ЖТ, культивируемых в питательной среде, обнаружены нейроподобные и астроцитоподобные формы нейроцитов с увеличенной длиной и количеством отростков, которые обычно были в несколько раз длиннее цитоплазматического тела нейроцитки. Местами в таких культурах нейроцитов отмечена тенденция к образованию межклеточных контактов. Постепенно увеличивалась доля нейроцитов пирамидной и звездчатой форм с наличием множественных ветвящихся отростков, имитирующих сетчатые структуры, характерные для архитектоники нервной ткани *in vivo* (**рис. 2**).

После 5-го пассажа в зоне роста культур МСК из ЖТ определяли нейроцитки угловатой формы с несколькими отростками с признаками дихотомического деления. Местами выявляли переходные типы ней-

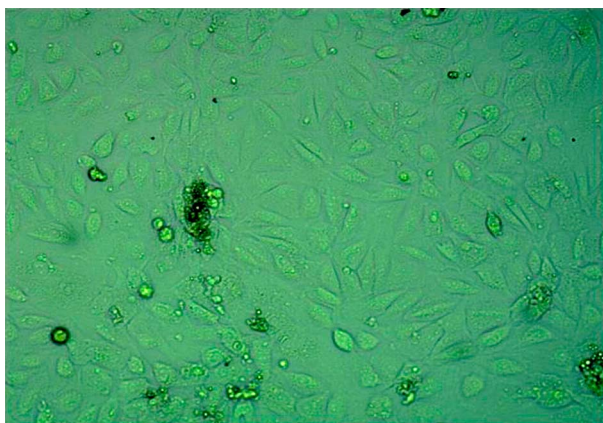


Рис. 1. Микрофото. Клеточный состав живой культуры МСК из ЖТ крысы на 9-е сутки. Пояснение в тексте. Ув. $\times 100$.

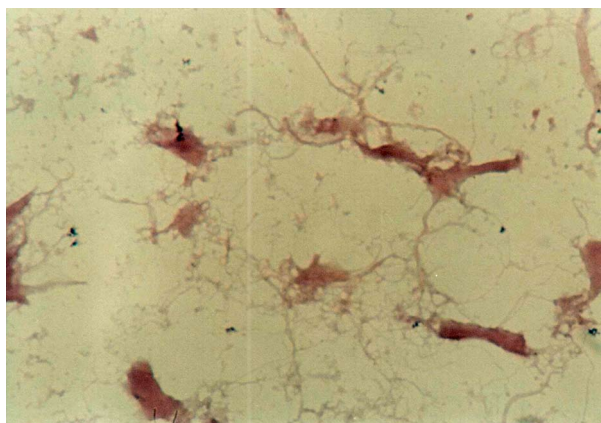


Рис. 2. Микрофото. МСК ЖТ человека. 2-й пассаж. 29-е сутки культивирования. Пояснение в тексте. Окрашивание гематоксилином Караччи. Ув. $\times 400$.

роклеток от биполярных к мультиполярным формам нейроцитов (**рис. 3**). Между такими нейроклетками обнаружены межклеточные контакты.

Таким образом, при культивировании МСК из ЖТ в присутствии ретиноевой кислоты достигнуто дифференцирование части клеток в нейрональном направлении. При этом доля таких клеток составляет приблизительно 10% от общего количества МСК недифференцированного типа.

В серии наблюдений МСК, культивированных в питательной среде с добавлением 5-азацитина, также определяли цитологические признаки фенотипической дифференцировки части клеток в нейроноподобные и глиоподобные формы с образованием хорошо развитых отростков разного типа (**рис. 4**).

При сопоставлении клеточного состава культур на цитологических препаратах МСК в сериях опытов с добавлением в культуральную среду ретиноевой кислоты и 5-азацитина, отдельно или одновременно, не удалось обнаружить каких-либо существенных различий эффективности индукции фенотипических признаков нейроглиальной дифференцировки в куль-

тивируемых МСК. Это позволяет предположить, что оба индуктора оказывают сходное влияние на способность МСК из ЖТ к нейроглиальной дифференцировке в условиях длительного культивирования.

При сравнительном анализе способности к индуцированной дифференцировке МСК, выделенных из ЖТ человека и крысы, установлено, что в условиях культивирования МСК из ЖТ обоих источников цитологические признаки дифференцировки в нейрональном и глиальном направлении однотипны. Важно, что в контрольных культурах, в которые индукторы дифференцировки не добавляли, на подложке определяли лишь изолированные клетки недифференцированного фенотипа округленной формы.

По данным иммуногистохимического исследования экспрессии кислого фибриллярного белка (GFAP) в цитоплазме МСК при культивировании МСК из ЖТ, в присутствии ретиноевой кислоты на 28-е сутки культивирования в цитоплазме большинства нейроклеток выявляли включения продукта реакции на GFAP в виде зернистости коричневой окраски, что отражало их нейроглиальный генез (**рис. 5**). В

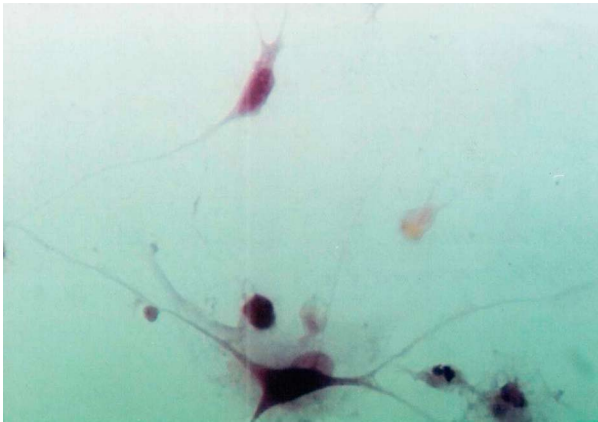


Рис. 3. Микрофото. Признаки нейрогенной дифференцировки МСК из ЖТ крысы. 31-е сутки роста в питательной среде с ретиноевой кислотой, 5-й пассаж. Нейроклетки нейроноподобного фенотипа с дихотомически ветвящимися отростками. Окраска гематоксилином Караччи. Ув.×800.

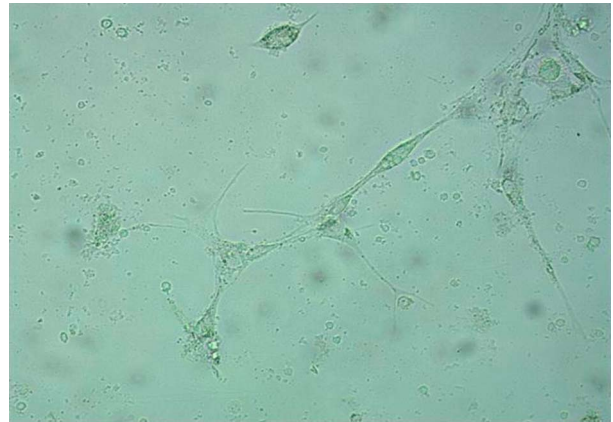


Рис. 4. Микрофото. Живая культура МСК из ЖТ крысы, 5-й пассаж. Наличие 5-азацитина в питательной среде. Пояснение в тексте. Ув.×400.

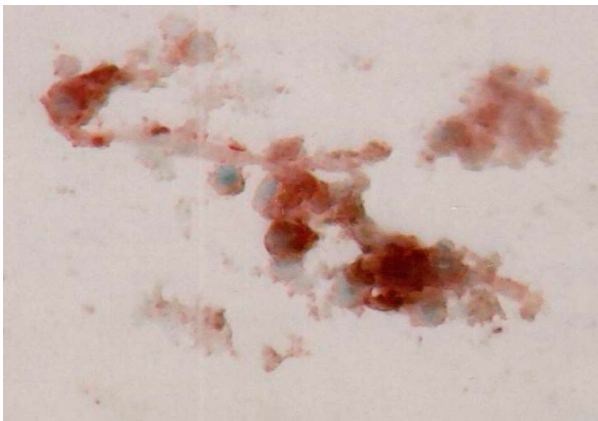


Рис. 5. Микрофото. Культура МСК из ЖТ при добавлении ретиноевой кислоты в питательную среду. Комплекс нейроклеток с позитивной иммуногистохимической реакцией на GFAP. Ув.×800

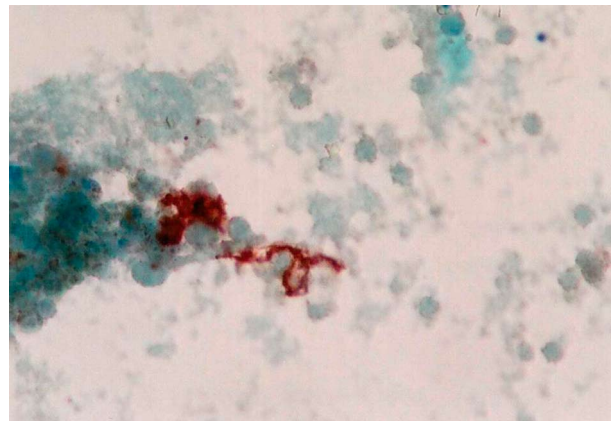


Рис. 6. Микрофото. Культура МСК из ЖТ при добавлении 5-азацитина в питательную среду. Комплекс нейроклеток с позитивной реакцией на GFAP в цитоплазме. Ув.×800.

отличие от этого, в контрольных культурах МСК в эти сроки при отсутствии в питательной среде индукторов дифференцировки в цитоплазме клеток продукт реакции не обнаружен.

При иммуногистохимическом исследовании препаратов МСК из ЖТ, культивируемых с 5-азациитидином, также отмечена позитивная реакция на GFAP в цитоплазме некоторых нейроцитов в виде включений компактной зернистости продукта реакции коричневого окраски (рис. 6).

Выводы. 1. Использование методики получения клеточного материала из СВФ ЖТ экспериментальных животных и человека и последующее долгосрочное культивирование позволяют получать фракцию МСК.

2. Цитологический анализ клеточного состава культур в динамике наблюдения показал, что по фенотипическим признакам культивируемые клетки относятся к МСК. Они проявляют адгезивные свойства, приобретают фибробластоподобный фенотип, способность к пролиферации и пластичности.

3. Наличие в культуральной среде индукторов специфической дифференцировки — ретиноевой кислоты и/или 5-азациитидина стимулирует появление цитологических признаков индуцированной нейроглиальной дифференцировки в части клеток. Это проявляется формированием характерного фенотипа нейроцитов и астроцитов с тенденцией к образованию сетчатых структур, свойственных нервной ткани, что подтверждается данными иммуногистохимических исследований культивированных клеток с выявлением GFAP в цитоплазме трансформированных клеток.

4. При сравнительной оценке цитологических препаратов культивируемых МСК в сериях опытов с добавлением в культуральную среду ретиноевой кислоты и 5-азациитидина, отдельно или одновременно, не обнаружены существенные различия эффективности направленной индукции нейроглиальной дифференцировки в культивируемых МСК.

Список литературы

1. US Patent 7078230. Adipose tissue-derived stromal cells for that expresses characteristics of a neuronal cell / W.O. Wilkinson, G.M. Gimble. — Appl. N:09/793173, 07/18/2006.
2. US Patent 7582292. Adipose tissue derived stromal cells for the treatment of neurological disorders / W.O. Wilkinson, J.M. Gimble, P. Vanguri. — Appl. N:11/286900, 09/01/2009.
3. Десятилетний опыт применения биотехнологий / В.К. Гринь, А.Г. Попандоуло, А.А. Шутин А.М. Гнилырибов, О.И. Миминошвили, Э.Я. Фисталь, В.Ю. Михайличенко // Вестн. неотлож. и восстановит. медицины. — 2012. — Т.13, №1. — С.3–9.
4. Исследование влияния мезенхимальных стволовых клеток на восстановление двигательных и когнитивных функций у крыс после острой фокальной ишемии головного мозга / В.К. Гринь, А.Г. Попандоуло, Б.Б. Ивнев, Р.М. Радык // Вестн. неотлож. и восстановит. медицины. — 2012. — Т.13, №1. — С.151.
5. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats / S.K. Kang, D.H. Lee, Y.C. Bae, H.K. Kim, S.Y. Baik, J.S. Jung // Exp. Neurol. — 2003. — N183. — P.355–366.
6. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model / J. Kim, S. Lee, K. Chu, K.H. Jung, E.C. Song, S.J. Kim, D.I. Sinn, J.H. Kim, D.K. Park, K.M. Kang, N.H. Hong, H.K. Park, C.H. Won, K.H. Kim, M. Kim, S. K. Lee, J.K. Roh // Brain Res. — 2007. — V.1183. — P.43–50.
7. Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека для компенсации неврологического дефицита у крыс, вызванного введением 3-нитропропионовой кислоты / А.В. Куликов, М.С. Степанова, С.Л. Стволинский, Р.М. Худоевков, Д.Н. Воронков, А.А. Ржанинова, Д.В. Гольдштейн, А.А. Болдырев // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2008. — №2. — С.83–89.
8. Kim S. Motor function recovery after adipose tissue derived mesenchymal stem cell therapy in rats with cerebral infarction / S. Kim, D. Lee, Y. Bae // J. Korean Neurosurg. Soc. — 2006. — V.40, N4. — P.267–272.
9. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis / G. Constantin, S. Marconi, B. Rossi, S. Angiari, L. Calderan, E. Anghileri, B. Gini, S.D. Bach, M. Martinello, F. Bifari, M. Galiè, E. Turano, S. Budui, A. Sbarbati, M. Krampera, B. Bonetti // Stem Cells. — 2009. — V.27, N10. — P.2624–2635.
10. Adipose stromal cells secreted neuroprotective media against neuronal apoptosis / X. Wei, L. Zhao, J. Zhong, H. Gu, D. Feng, B.H. Johnstone, K.L. March, M.R. Farlow, Y. Du // Neurosci. Lett. — 2009. — V.462, N1. — P.76–79.
11. Репин В.С. Эмбриональная стволовая клетка: от фундаментальных исследований в клинику / В.С. Репин // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 2001. — №2. — С.3–8.
12. Zavan B. Neural Potential of Adipose Stem Cells / B. Zavan // Discovery Med. — 2010. — N50. — P.37–43.
13. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue / N. Yamamoto, H. Akamatsu, S. Hasegawa, T. Yamada, S. Nakata, M. Ohkuma, E. Miyachi, T. Marunouchi, K. Matsunaga // J. Dermatol. Sci. — 2007. — V.48, N1. — P.43–52.
14. Морфология, кинетика роста и фенотип мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека / М.М. Зафранская, Н.В. Ламовская, Д.Б. Нижегородова, М.Ю. Юркевич, С.С. Багатка, С.Ю. Мечковский, Г.И. Иванчик // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2010. — №4. — С.86–93.

Семенова В.М.¹, Лісяний М.І.², Стайно Л.П.¹, Бельська Л.М.², Єгорова Д.М.¹

¹ Лабораторія культивування тканин, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

² Відділ нейроімунології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

Проліферативний та диференціувальний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин з жирової тканини в умовах культивування

Мета. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) з жирової тканини (ЖТ) експериментальних тварин і людини для вивчення індукції нейрогенного диференціювання.

Матеріали і методи. Для культивування МСК використана ЖТ від 30 експериментальних тварин та 5 пацієнтів. Культури МСК досліджені протягом 5 пасажів. Для індукування нейрогенного диференціювання використані ретиноева кислота (1 мкмоль) та/або 5-азацитидин (1 мкмоль). Культури вивчені прижиттєво, а також за даними цитологічного та імуногістохімічного досліджень.

Результати. В культурах клітин з ЖТ відзначений ріст фібробластоподібних МСК. У присутності факторів специфічного диференціювання вони набувають нейроноподібного або астроцитоподібного фенотипу з позитивною реакцією на GFAP.

Висновки. В культурах клітин з ЖТ експериментальних тварин та людини отримана фракція МСК, здатних до індукованого нейрогенного диференціювання під впливом ретиноевої кислоти та/або 5-азацитидину, що підтверджують дані імуногістохімічних досліджень.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, жирова тканина, культура, нейрогліальне диференціювання.

Укр. нейрохірург. журн. — 2014. — №3. — С. 24-29.

Надійшла до редакції 05.03.14. Прийнята до публікації 25.04.14.

Адреса для листування: Семенова Віра Михайлівна, Лабораторія культивування тканин, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна, 04050, e-mail: seveme22@rambler.ru

Semenova V.M.¹, Lisianiy M.I.², Stayno L.P.¹, Belska L.M.², Yegorova D.M.¹

¹ Tissue Culture Laboratory, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

² Neuroimmunology Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

Proliferative and differentiated potential of mesenchymal stem cells from adipose tissue under cultivation conditions

The purpose. Cultivation of mesenchymal stem cells (MSCs) from adipose tissue (AT) of experimental animals and humans to study induction of neurogenic differentiation.

Materials and methods. AT samples from 30 experimental animals and 5 patients were used. MSCs cultures were studied for 5 passages. To induce neurogenic differentiation retinoic acid (1 mkM) and/or 5-azacytidine (1 mkM) were used. Cultures were observed in vivo, also according to cytological and immunohistochemical studies.

Results. Fibroblast-like MSCs growth was observed in cell cultures from AT. At presence of specific differentiation factors they acquired neuron-like or astrocyte-like phenotype with positive staining to GFAP.

Conclusions. In cultures of animal and human AT cells fraction of MSCs was derived, capable to induce neurogenic differentiating under the influence of retinoic acid and/or 5-azacytidine, as confirmed by immunohistochemistry.

Key words: mesenchymal stem cells, adipose tissue, culture, neuroglial differentiation.

Ukr Neyrokhir Zh. 2014; 3: 24-9.

Received, March 5, 2014. Accepted, April 25, 2014.

Address for correspondence: Vera Semenova, Tissue Culture Laboratory, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov, 32 Platona Mayborody St., Kiev, Ukraine, 04050, e-mail: seveme22@rambler.ru