

Метод дифференцировки стволовых клеток в кардиомиоцитоподобные

В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, А.В. Оберемко, В.В. Буше

Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака АМН Украины, г. Донецк

Method of Stem Cell Differentiation in Cardiomyocyte-like Ones

V.K. GRIN', A.G. POPANDOPULO, A.V. OBEREMKO, V.V. BUSHE

V.K. Gusak Institute of Emergency and Reconstructive Surgery
of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Donetsk, Ukraine

Для исследования возможности дифференцировки клеток стромы костного мозга по кардиомиоцитарному пути была проведена серия экспериментов. Культуру стромальных стволовых клеток получали из костного мозга путём механической дезагрегации, центрифугирования с последующим высеиванием в культуральные флаконы 75 см² ("Costar", США). Первично выделенную культуру ССК вели на ростовой среде DMEM/F12 1:1 ("Sigma", США) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки ("Биолот", Россия), глутамина ("Биолот", Россия), L-аскорбиновой кислоты ("Sigma", США) и основного фактора роста фибробластов ("Sigma", США). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (37°C, содержание углекислого газа 5% и влажность 95%). Среду меняли каждые 3-е суток. При достижении 70–80% монослоя клетки пассировали раствором 0,25% трипсин/версена (1:5).

Конфлуентную культуру второго пассажа стимулировали к дифференцировке добавлением в культуральную среду 5-азациитидина в концентрации 10 мкмоль/л на 24 ч. После этого среду заменяли на среду DMEM/F12 1:1 ("Sigma", США), содержащую дополнительно 20% фетальной телячьей сыворотки ("Биолот", Россия), глутамин ("Биолот", Россия), инсулин ("Sigma", США), дексаметазон ("Sigma", США), L-аскорбиновую кислоту ("Sigma", США) и фактор роста фибробластов b (FGFb) ("Sigma", США). Среду меняли каждые 3-е суток.

Изменение клеточной морфологии наблюдали визуально при помощи метода световой микроскопии. Через одну неделю после начала индукции культура представляла собой монослой фибробластоподобных клеток. В конце второй недели появлялись продольные кардиомиоцитоподобные мускульные клетки, до 20% от общего количества клеток. Через 3–4 недели культивирования до 30% клеток спонтанно сокращались и содержали от одного до нескольких ядер.

Для подтверждения состоявшейся дифференцировки ССК в кардиомиоцитоподобные клетки использовали иммуногистохимический метод идентификации в культурах этих клеток специфических белков – тропонина I и актина с помощью моноклональных антител. Фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию проводили на микроскопе "Laborux" ("Leica", Германия).

The series of experiments were carried-out for studying the possibility for bone marrow stromal cell differentiation by cardiomyocyte way. The culture of stromal stem cells was derived from bone marrow via mechanical disaggregation and centrifugation with following inoculation in 75 cm² cultural flasks ("Costar", USA). Primarily isolated SSCs culture was plated on DMEM/F12 1:1 growth medium ("Sigma, USA") with adding 20% fetal calf serum ("Biolog", Russia), glutamine ("Biolog", Russia), L-ascorbic acid ("Sigma, USA") and main fibroblast growth factor ("Sigma", USA). Cells were cultured in CO₂-incubator (37°C, 5% CO₂ content and 95% humidity). Medium was changed each 3 days. When achieving 70-80% monolayer the cells were passed with 0.25% trypsin/versene solution (1:5)

Confluent culture of the second passage was stimulated to differentiation by adding into cultural medium of 5-azacytidine in 10 μM/l concentration for 24 hrs. Afterwards the medium was changed for DMEM/F12 1:1 ("Sigma", USA), additionally containing 20% fetal bovine serum ("Biolog", Russia), glutamine ("Biolog", Russia), insulin ("Sigma", USA), dexamethazone ("Sigma", USA), L-ascorbic acid ("Sigma", USA) and fibroblast growth factor b (FGFb) ("Sigma, USA"). The medium was changed every 3 days.

Change in cell morphology was visually observed by means of light microscopy. One week after beginning the induction, the culture represented a monolayer of fibroblast-like cells. At the end of the second week the lateral cardiomyocyte-like muscular cells, up to 20% of total cell amount, appeared. Three-four weeks after culturing up to 30% of cells contracted spontaneously and contained from one to several nuclei.

To confirm the occurred SSCs differentiation in cardiomyocyte-like cells we used the immune histochemical method of identification of specific proteins: troponin I and actin using monoclonal antibodies in cultures of these cells. Phase-contrast and fluorescent microscopies were done with "Laborux" microscope ("Leica", Germany).