

Рост и адипогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток из костного мозга и дермы человека при монослойном и объемном культивировании в составе альгинатных микросфер и широкопористых скаффолдов[#]

UDC 611.018.46.085.23:014.41:018.2/6:57.08

A.I. PRAVDYUK*, V.S. ZAYKOV, E.YU. ROGULSKAYA, E.B. REVENKO, R.V. IVANOV, YU.A. PETRENKO

Growth and Adipogenic Differentiation of Human Bone Marrow and Dermis Derived Mesenchymal Stromal Cells during 2D and 3D Culturing within Alginate Microbeads and Macroporous Scaffolds[#]

В настоящее время для восстановления мягких тканей обычно применяется имплантация собственной (аутологичной) жировой ткани пациента [3] либо синтетических материалов, в основном силиконовых имплантатов. Однако при использовании таких синтетических материалов нередко происходят разрыв, утечка содержимого или сдвиг имплантата. Кроме того, они обладают недостаточной биосовместимостью. Несмотря на популярность данных подходов, в основном они направлены на замещение лишь формы поврежденной ткани. При этом трансплантация собственной жировой ткани остается малоэффективной, что связано с недостаточной неоваскуляризацией жирового трансплантата и в результате – потерей его объема. Инъекция суспензии адипоцитов также не является полноценной альтернативой ввиду хрупкости и чрезвычайной повреждаемости этих клеток в ходе липосакции [5].

Методы и подходы тканевой инженерии чрезвычайно перспективны для решения задач, связанных с восстановлением объема и функции жировой ткани. Среди материалов для создания трехмерных матриц-носителей природного происхождения одно из первых мест занимает альгинат – линейный полисахарид, получаемый из бурых водорослей. В качестве клеточного компонента при разработке биоэквивалентов тканей с использованием подходов тканевой инженерии наиболее перспективными являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), обладающие высокими пролиферативными свойствами *in vitro*, а также способностью к направ-

The reconstruction of soft tissues is usually prepared by the implantation of either autologous adipose tissue of a patient [3] or synthetic materials (mainly silicon implants). However, when using these synthetic materials the ruptures, leakages or implant dislocation are frequently observed. In addition, they are insufficiently biocompatible. In spite of the popularity of these approaches they are mainly directed to reconstruct only the shape of damaged tissue. Herewith the transplantation of autologous adipose tissue has remained inefficient. It is associated with insufficient neovascularization of adipose transplant and as a result the loss of its bulk. Injection of adipocyte suspension is not a valuable alternative due to fragility and sensitivity of these cells to the liposuction procedure [5].

Methods and approaches of tissue engineering are extremely promising to solve the problems associated with restoration of volume and function of adipose tissue. Among the naturally derived materials for designing 3D carrier matrices the alginates, linear polysaccharides, derived from brown algae could be considered as a most promising. As a cell component for development of tissue bioequivalents using tissue engineering approaches the multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) possessing high proliferative properties *in vitro* as well as capability to directed multilineage differentiation are the most prospective. These cells can be derived from various sources such as bone marrow, adipose tissue, placenta, synovial membrane, periosteum *etc.* [8].

Only recently the heterogenous populations of dermal fibroblast-like cells were considered as an available sour-

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
pravduke@yandex.ru

[#] Данное исследование было представлено на мини-симпозиуме
«День стволовой клетки», проходившем 22 мая 2012 года в
г. Харькове.

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: pravduke@yandex.ru

[#] This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22nd of May, 2012.

ленной мультилинейной дифференцировке. Они могут быть выделены из различных источников: костного мозга, жировой ткани, плаценты, синовиальной мембраны, надкостницы и др. [8].

Сравнительно недавно гетерогенные популяции дермальных фибробластоподобных клеток стали рассматриваться в качестве доступного источника мультипотентных МСК [2, 4, 8]. В немногочисленных исследованиях показана способность дермальных фибробластов к направленной дифференцировке *in vitro* в адипо-, остео-, хондрогенном [2, 4] направлениях, а также в инсулинпродуцирующие клетки [1].

В настоящей работе исследованы пролиферативные и дифференцировочные свойства МСК, выделенных из костного мозга и дермы взрослого человека, при монослойном и объемном культивировании в составе альгинатных микросфер и широкопористых губок.

В работе использовали МСК 4-го пассажа, выделенные из костного мозга (МСК-КМ) и дермы (МСК-Д) взрослого человека.

Культивирование клеток проводили в среде α -MEM («Sigma», США), дополненной 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота («Биолот», Россия), 2 мМ *L*-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Иммунофенотипические исследования выполняли с помощью проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки 4-го пассажа окрашивали моноклональными антителами CD29, CD34, CD73, CD90 и CD105 и анализировали на проточном цитометре «FACS Calibur» («BD Biosciences», США).

Для заключения МСК в альгинатные микросферы клетки ресуспендировали в очищенном 1,2% растворе альгината натрия («Sigma»), после чего суспензию покапельно вносили в раствор 100 мМ CaCl₂ на 10 мин для полимеризации. Полученные инкапсулированные МСК отмывали физиологическим буфером, содержащим 0,9% NaCl и 25 мМ HEPES, и использовали для дальнейших экспериментов.

Широкопористые альгинатные скаффолды в виде дисков толщиной 2 мм были получены как описано ранее [7]. Заселение скаффолдов проводили с использованием разработанного нами перфузионного метода [6].

Для оценки активности пролиферативно-метаболических процессов в МСК при монослойном культивировании, а также в составе альгинатных микросфер и широкопористых скаффолдов применяли тест с Alamar Blue (AB).

Жизнеспособность МСК-КМ и МСК-Д в составе трехмерных носителей оценивали двойным окрашиванием флуоресцеин диацетатом и этидиум бромидом, а также с помощью МТТ-теста.

ce of multipotent MSCs [2,4,8]. In a few studies a capability of dermal fibroblasts to the *in vitro* differentiation towards adipo-, osteo- and chondrogenic lineages [2,4], as well as insulin-producing cells [1] have been shown.

This research was performed to assess proliferative and differentiation properties of MSCs, derived from adult bone marrow and dermis during 2D and 3D culturing within alginate microspheres and macroporous sponges.

The investigations were prepared using the MSCs of the 4th passage derived from adult bone marrow (MSCs of BM) and dermis (dermal MSCs).

The cells were cultured in α -MEM (Sigma, USA) medium supplemented with 10% fetal calf serum (Biolog, Russia), 2 mM of *L*-glutamine, 50 units/ml of penicillin and 50 mg/ml of streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity.

Immunophenotypic studies were performed by flow cytometry. The 4th passage cells were stained with monoclonal antibodies for CD29, CD34, CD73, CD90 and CD105 and analyzed with flow cytometer FACS Calibur (BD Biosciences, USA).

To encapsulate MSCs into alginate microbeads the cells were re-suspended in purified 1.2% sodium alginate (Sigma, USA), then, the suspension was drop-wise introduced into 100 mM of CaCl₂ for 10 min to perform polymerization. The obtained encapsulated MSCs were washed with physiological buffer, containing 0.9% NaCl and 25 mM HEPES and used in further experiments.

Macroporous alginate scaffolds in the form of 2 mm disks were obtained according to the previously described method [7]. Scaffolds were seeded by the application of previously developed perfusion method [6].

To assess the activity of proliferative and metabolic processes in MSCs during 2D culturing as well during culturing in alginate microbeads and macroporous scaffolds the Alamar Blue (AB) test was applied.

Viability of BM MSCs and dermal MSCs in 3D carriers was assessed by double staining with fluorescein diacetate and ethidium bromide as well as MTT-test. For induction of adipogenic differentiation the MSCs were cultured for 3 weeks in DMEM medium, containing factors, stimulating adipogenesis (Adipogenic Stimulatory Factors, Stem Cell Technologies Inc., Canada). Direction and level of cell differentiation towards adipogenic lineage were assessed by accumulation of intracellular neutral lipids, positively stained with Oil Red O or Nile Red.

The assessment of immunophenotype of the 4th passage fibroblast-like cells (Fig. 1), derived from adult bone marrow and derma showed that more than 90% of cells in the cultures expressed markers of MSCs (CD29, CD73, CD90, CD105).

Induction of BM MSCs and dermal MSCs towards adipogenic direction was accompanied with the accumu-

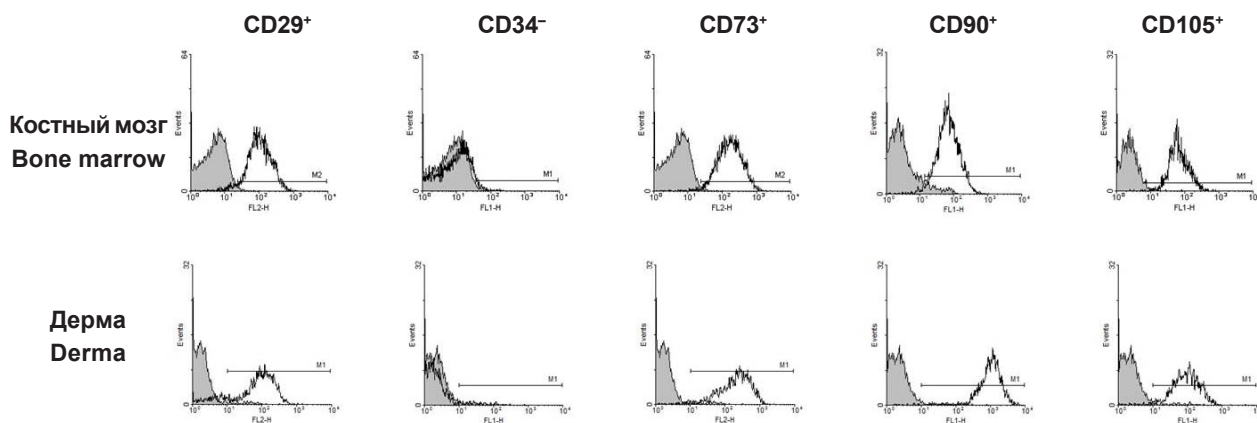


Рис. 1. Иммунофенотип фибробластоподобных клеток 4-го пассажа, выделенных из костного мозга и дермы взрослого человека.

Fig. 1. Immunophenotype of 4th passage fibroblast-like cells, derived from adult bone marrow and dermis.

Для индукции адипогенной дифференцировки МСК культивировали в течение 3-х недель в среде DMEM, содержащей факторы, стимулирующие адипогенез (Adipogenic Stimulatory Factors, «Stem Cell Technologies Inc.», Канада). Направленность и степень дифференцировки клеток в адипогенном направлении оценивали по накоплению внутриклеточных нейтральных липидов, позитивно окрашивающихся Oil Red O или нильским красным.

Исследование иммунофенотипа фибробластоподобных клеток 4-го пассажа (рис. 1), выделенных из костного мозга и дермы взрослого человека, показало, что более 90% клеток в культурах экспрессировали маркеры МСК (CD29, CD73, CD90, CD105).

При индукции МСК-КМ и МСК-Д в адипогенном направлении отмечалось накопление внутриклеточных липидов, позитивно окрашивающихся Oil Red O. После 21 суток культивирования в остеогенной среде клетки из обоих источников характеризовались экспрессией щелочной фосфатазы, при этом наблюдалась минерализация внеклеточного матрикса, позитивно окрашивающегося нитратом серебра по методу von Kossa. Эти данные подтверждают принадлежность исследованных культур клеток к МСК.

Процесс инкапсуляции МСК в альгинатные микросферы не влиял на жизнеспособность клеток. При дальнейшем культивировании в альгинатных микросферах клетки сохраняли округлую форму и не пролиферировали независимо от ткани-источника МСК. При этом жизнеспособность МСК, оцененная с использованием МТТ-теста и двойного окрашивания ФДА/ЭБ, сохранялась на уровне 80–90%.

lation of intracellular lipids, positively stained with Oil Red O. After the 21st day of culturing in osteogenic medium the cells of both sources were characterized by expression of alkaline phosphatase, herewith mineralization of intracellular matrix, positively stained with argentic nitrate according von Kossa was observed. These data confirmed that the investigated cell cultures belonged to MSCs.

Encapsulation of MSCs into alginate microspheres did not affect cell viability. During further culturing of MSCs in alginate microspheres, cells preserved their round shape and did not proliferate, independently of the tissue source of MSCs. The viability of MSCs assessed by MTT-test and double staining with FDA/EB was preserved at the level of 80–90%.

And *vice versa* culturing of BM MSCs and dermal MSCs within the macroporous alginate scaffolds resulted in proliferation of the cells. MSCs filled the pores and distributed through the whole volume of the carrier. Furthermore the proliferation assessed by AB did not significantly differ from the indices obtained during monolayer culturing of cells.

The adipogenic induction of cells, cultured as monolayer and within the alginate microspheres and macroporous alginate scaffolds, resulted in accumulation of intracellular lipids, stained positively by Oil Red O and Nile Red (Fig. 2).

Thus, the presented results demonstrate the promise of using 3D bioengineered constructs based on MSCs derived from human adult bone marrow and dermis, as well as alginate carriers for the engineering of adipose tissue.

Напротив, при культивировании МСК-КМ и МСК-Д в широкопористых альгинатных скаффолдах клетки пролиферировали, заполняя поры и распределяясь по всему объему носителя. При этом уровень пролиферации по АВ достоверно не отличался от показателей, полученных при монослойном культивировании клеток.

Индукция клеток, культивированных в виде монослоя, а также в составе альгинатных микросфер и широкопористых альгинатных скаффолдов в адипогенном направлении приводила к накоплению в них внутриклеточных липидов, которые окрашивались Oil Red O или нильским красным (рис. 2).

Таким образом, представленные результаты демонстрируют перспективность применения трехмерных биоинженерных конструкций на основе МСК костного мозга и кожи взрослого человека, а также альгинатных носителей для инженерии жировой ткани.

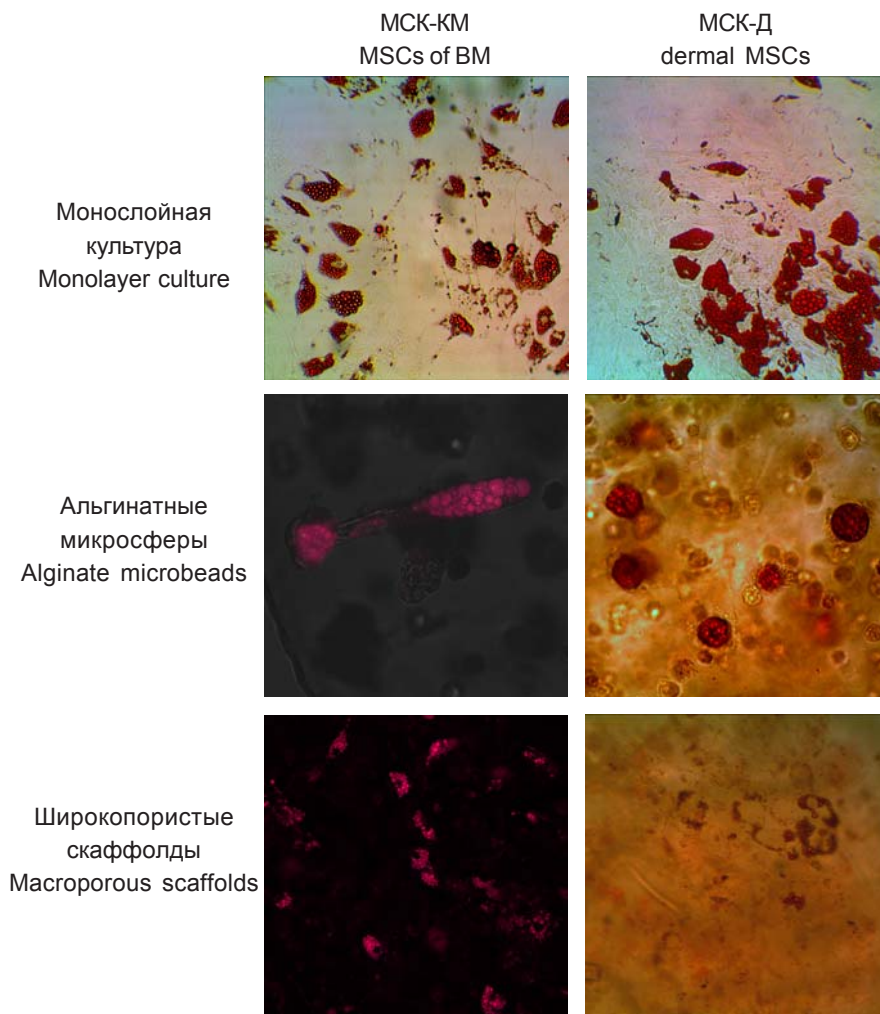


Рис. 2. Адипогенная дифференцировка МСК-КМ и МСК-Д при монослойном культивировании, а также в составе альгинатных микросфер и широкопористых скаффолдов.

Fig. 2. Adipogenic differentiation of BM MSCs and dermal MSCs in monolayer culture, as well as in alginate microbeads and macroporous scaffolds.

Литература

1. Bi D., Chen F.G., Zhang W.J. et al. Differentiation of human multipotent dermal fibroblasts into islet-like cell clusters// BMC Cell Biol. – 2010. – Vol. 11, №46. – P. 1–7
2. Blasi A., Martino C., Balducci L. et al. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential // Vasc. Cell. – 2011. – Vol. 3, №5. – P.1–14
3. Choi J.H., Gimble J.M., Lee K. et al. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration // Tissue Eng. Part B Rev. – 2010. – Vol. 16, №4. – P. 413–426.
4. Lorenz K., Sicker M., Schmelzer E. et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts// Exp. Dermatol. – 2008. – Vol. 17, №11. – P. 925–932.
5. Patrick C.W., Mikos A.G., McIntire L.V. Frontiers in Tissue Engineering. – Oxford: Elsevier Science, 1998. – 717 p.
6. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Petrenko A.Y. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers // Bull. Exp. Biol. Med. – 2011. – Vol. 150, №4. – P. 543–546.

References

1. Bi D., Chen F.G., Zhang W.J. et al. Differentiation of human multipotent dermal fibroblasts into islet-like cell clusters// BMC Cell Biol. – 2010. – Vol. 11, N46. – P. 1–7
2. Blasi A., Martino C., Balducci L. et al. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential // Vasc. Cell. – 2011. – Vol. 3, N5. – P.1–14
3. Choi J.H., Gimble J.M., Lee K. et al. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration // Tissue Eng. Part B Rev. – 2010. – Vol. 16, N4. – P. 413–426.
4. Lorenz K., Sicker M., Schmelzer E. et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts// Exp. Dermatol. – 2008. – Vol. 17, N11. – P. 925–932.
5. Patrick C.W., Mikos A.G., McIntire L.V. Frontiers in Tissue Engineering. – Oxford: Elsevier Science, 1998. – 717 p.
6. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Petrenko A.Y. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers // Bull. Exp. Biol. Med. – 2011. – Vol. 150, N4. – P. 543–546.

7. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Y., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2011. – Vol. 22, №6. – P. 1529–1540
8. Stewart M.C., Stewart A.A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action// Vet. Clin. North Am. Equine Pract. – 2011. – Vol. 27, №2. – P. 243–261.
7. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Y., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2011. – Vol. 22, N6. – P. 1529–1540
8. Stewart M.C., Stewart A.A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action// Vet. Clin. North Am. Equine Pract. – 2011. – Vol. 27, N2. – P. 243–261.

Поступила 01.06.2012

Accepted 01.06.2012