

ОСТЕОГЕННЫЕ И АДИПОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

© Н. Г. Скоробогатова,¹ Н. А. Волкова, А. Ю. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;

¹ *электронный адрес: skorng@mail.ru*

Исследование дифференцировочного потенциала мультипотентных стромальных клеток-предшественников (КП) в эмбриогенезе имеет большое значение для понимания биологии этих клеток и их роли в процессах регенерации тканей взрослого организма. В настоящей работе в условиях монослойной культуры исследовали остеогенные и адипогенные потенциалы фибробластоподобных КП, полученных из фетальной печени человека 8—11 нед гестации, а также влияние на них экспозиции с криопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО). Показано, что в первичной суспензии клеток фетальной печени человека присутствуют ранние стромальные фибробластоподобные предшественники, способные к индуцированной остеогенной и адипогенной дифференцировке. Кратковременная экспозиция свежeweделенных клеток с ДМСО приводит к изменению свойств фибробластоподобных КП. При субкультивировании выявлено увеличение количества предшественников, способных к индуцированной остеогенной дифференцировке *in vitro*. Установленный факт влияния ДМСО на дифференцировочные потенциалы фетальных фибробластоподобных КП необходимо учитывать при разработке методов криоконсервирования стволовых клеток.

Ключевые слова: фибробластоподобные клетки-предшественники, фетальная печень человека, культура клеток, остеогенная и адипогенная дифференцировка, ДМСО.

Принятые сокращения: ДМСО — диметилсульфоксид, КМ — костный мозг, КОЕф — колониеобразующие единицы фибробластов, КП — клетки-предшественники, α -МЕМ — минимальная среда Игла в альфа-модификации, МСК — мезенхимные стволовые клетки.

Среди популяций клеток негемопозитического пула кроветворной ткани важное место занимают фибробластоподобные предшественники, способные к колониеобразованию *in vitro*, которые участвуют в создании микроокружения для гемопозитических клеток и сами дают начало специфическим линиям дифференцировок (Friedenstein et al., 1970; Castro-Malaspina et al., 1980; Owen, 1987). Известно, что становление кроветворения тесно взаимосвязано с формированием и функционированием стромы гемопозитического органа (Friedenstein et al., 1974; Чертков, Фриденштейн, 1977). В настоящее время признано, что в число колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) входят мезенхимные стволовые клетки (МСК) (Pittenger et al., 1999). Уникальные свойства МСК, такие как самоподдержание и способность к дифференцировке в клетки костной, хрящевой, жировой, мышечной и других типов тканей (Galmiche et al., 1993; Ferrari et al., 1998; Pittenger et al., 1999; Hughes, 2002), порождают большие надежды в области клеточной биологии, тканевой инженерии и регенерационной медицины. Биологический потенциал МСК и их ранних незрелых потомков в эмбриогенезе остается недостаточно изученным. Пренатальные КОЕф обладают более высокой пролиферативной активностью по сравнению с постнатальными (Versele et al., 1987). Известно, что увеличение количества КОЕф в эмбриональных кроветворных органах (в желточном мешке,

печени, селезенке и костном мозге — КМ) предшествует заселению их гемопозитическими клетками (Van den Heuvel et al., 1987). В этом аспекте печень человека первого триместра пренатального периода развития представляет особый интерес, поскольку входящие в ее состав гемопозитические клетки способны мигрировать в другие органы в ходе формирования кроветворной системы. Показано, что печень плода человека первого триместра пренатального развития наряду с преобладающими в ней гемопозитическими клетками содержит мультипотентные МСК и их ранние недифференцированные потомки (Campagnoli et al., 2001; O'Donoghue, Fisk, 2004), которые характеризуются высоким пролиферативным потенциалом и также способны к миграции.

Дифференцировочный потенциал МСК, выделенных из различных органов плода человека, неодинаков (In't Anker et al., 2003; Горностаева и др., 2006), поэтому исследование дифференцировочных свойств пренатальных МСК и их незрелых потомков необходимо для понимания развития этих клеток и открывает новые возможности в области клеточной биологии.

Работа с изолированными клетками во многих случаях связана с необходимостью криоконсервирования клеточных суспензий. Для обеспечения защиты клеток при замораживании традиционно применяют диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации 0.7—1.4 М. Однако вли-

яние этого криопротектора на дифференцировочные потенции фибробластоподобных предшественников, включая МСК, до настоящего времени не изучалось.

Цель настоящего исследования — оценить способность фибробластоподобных клеток-предшественников (КП), выделенных из фетальной печени человека, к индуцированной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях в условиях *in vitro*, а также изучить влияние кратковременной экспозиции первичной суспензии клеток с криопротектором ДМСО на исследуемые дифференцировочные свойства.

Материал и методика

В работе были использованы фрагменты печени от 9 плодов человека 8—11 нед гестации, полученные после планового прерывания беременности по социальным показаниям при соблюдении этических норм использования данного вида биоматериала в исследовательских целях. Материал и методика исследований были одобрены комиссией по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

Получение первичной суспензии клеток осуществляли ферментативным методом (Демидова и др., 1971). В стерильных условиях фрагменты фетальной печени человека тщательно промывали в бессывороточной среде, измельчали до размеров около 1 мм³ и помещали в предварительно подогретый (до 37 °С) раствор трипсина (0.25 %) на 30 мин при постоянном перемешивании. Трипсин инактивировали с помощью эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (10 %) в течение 5—7 мин. Полученную клеточную суспензию пропускали через фильтр от системы для переливания кровезаменителей. Затем клетки осаждали центрифугированием (200 g, 7 мин), осадок ресуспендировали в 2 мл среды 199. Количество клеток в суспензии определяли при стандартном подсчете в камере Горяева.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью экспресс-теста по прижизненному окрашиванию раствором трипанового синего (0.4 %).

Условия проведения эксперимента. Первичную суспензию от каждого образца фетальной печени перед культивированием делили на 2 части (опыт и контроль). Клетки опытной группы экспонировали при 4 °С в 0.7 М растворе ДМСО, приготовленном на основе среды 199 с 20 % эмбриональной сыворотки. По окончании времени экспозиции (30 мин) ДМСО удаляли путем медленного разбавления суспензии клеток 10-кратным объемом культуральной среды и последующего центрифугирования (200 g, 10 мин). Клетки контрольной группы хранили в среде 199 с эмбриональной сывороткой (20 %) при 4 °С в течение 30 мин.

Первичная культура. Культивирование адгезивной фракции первичной суспензии клеток фетальной печени человека проводили на основе метода, разработанного для стромальных клеток КМ (Friedenstein et al., 1970). Клетки культивировали в минимальной среде Игла в альфа-модификации (α -MEM), дополненной эмбриональной сывороткой (20 %) и антибиотиками (50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина), в культуральных флаконах объемом 25 см² (Costar, США) в стандартных условиях (37 °С, влажность 100 %, CO₂ 5 %). Плотность посева составляла 200 000—400 000 клеток/см². На 3-и сут культивирования неприкрепившиеся клетки удаляли, а адгезировавшие клетки продолжали культивиро-

вать в монослое, осуществляя замену среды 1 раз в нед. По достижении клетками субконфлюэнтного роста (около 60—70 %) проводили субкультивирование. Для выявления КОЕф в первичной суспензии клеток фетальной печени человека использовали посевную дозу 20 000—40 000 клеток/см², определенную нами ранее (Грищенко и др., 2005). Культивирование проводили в течение 14 сут. Затем культуры фиксировали и окрашивали азуром-эозином для морфологического исследования.

Субкультивирование. Клетки монослоя снимали с помощью 0.25%-ного раствора трипсина и пересеивали с плотностью 20 000—40 000 клеток/см² в новую посуду в среду MesenCult™ MSC Basal Medium (Human), дополненную 10 % эмбриональной сыворотки. Клетки культивировали в монослое, смену среды осуществляли 1 раз в нед. При повторном пассировании перед посевом клетки каждой культуры были разделены на 3 части: 1) для индукции остеогенной дифференцировки, 2) для индукции адипогенной дифференцировки, 3) для контроля спонтанных дифференцировок. Затем клетки пересеивали в соответствующие среды для проведения индуцированных в культуре остео- и адипогенной дифференцировок.

Культивирование клеток в индуцирующих дифференцировку средах проводили в 24-луночных планшетах (Costar, США) согласно протоколам фирмы-производителя (Stem Cell Technologies Inc., Канада). Использовали низкую посевную плотность (3000 клеток/см²) в соответствии с методикой, разработанной для КМ (Bruder et al., 1997). Индукцию остеогенной дифференцировки осуществляли в культуральной среде MesenCult™ MSC Basal Medium (Human), в которую были добавлены специальные компоненты — дексаметазон (0.1 мкМ), аскорбиновая кислота (0.05 мМ), глицерол-2-фосфат (10 мМ) и эмбриональная сыворотка (10 %); для индукции адипогенной дифференцировки использовали среду MesenCult™ MSC Basal Medium (Human), дополненную стимулирующими адипогенез компонентами — Adipogenic Stimulatory Supplements (Human). Культивирование исследуемых клеток проводили в течение 19 сут, смену сред осуществляли каждые 3 сут. Негативными контролями на спонтанную дифференцировку служили фибробластоподобные КП от тех же образцов исследуемых суспензий, культивированные в среде MesenCult™ MSC Basal Medium (Human), дополненной эмбриональной сывороткой (10 %), не содержащей указанных специфических компонентов.

Морфологические исследования. Прижизненное наблюдение за культурами осуществляли ежедневно с помощью инвертированного микроскопа (СЕТІ, Португалия). По окончании опыта культуры тщательно промывали раствором Хенкса и фиксировали в Са—формоле в течение 30 мин при 4 °С. Оценку способности исследуемых КП к остеогенной и адипогенной дифференцировке проводили с помощью цитохимического окрашивания. Дифференцирующиеся остеогенные клетки выявляли по окрашиванию на щелочную фосфатазу (ранний признак остеогенной дифференцировки) набором kit 85L-2 (согласно инструкции фирмы-производителя); внутриклеточное накопление нейтральных липидов (маркер адипогенной дифференцировки клеток) определяли по окрашиванию Oil Red O (Kilman, 1990). Контрольные культуры (на спонтанную дифференцировку) фиксировали и окрашивали в тех же условиях. Часть культур в каждой серии фиксировали 96%-ным этанолом в течение

20 мин и окрашивали азуром—эозином по Романовскому—Гимза.

Анализ полученных результатов. Все эксперименты проводили с тройным повтором. В остеогенных культурах при световой микроскопии определяли относительное содержание позитивно окрашенных на щелочную фосфатазу клеток по отношению к общему количеству клеток в культуре (оценку проводили в 10—15 случайно выбранных полях зрения). Результаты выражали в процентах. На микрофотографиях приведены изображения, типичные для всех культур, исследованных в эксперименте.

Материалы. В работе использовали трипановый синий, масляный красный (Oil Red O), набор для выявления щелочной фосфатазы (Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit 85L-2), аскорбиновую кислоту, глицерол-2-фосфат, дексаметазон, среду альфа-МЕМ и трипсин (Sigma, США); среду для культивирования МСК человека — MesenCult™ MSC Basal Medium (Human), Adipogenic Stimulatory Supplements (Human) (Stem Cell Technologies Inc., Канада); диметилсульфоксид «чда» (Макрохим, Украина); среду 199 с солями Хенкса и глутамином (ПанЭко, Россия); раствор Хенкса (ГУП ИПВЭ им. М. П. Чумакова РАМН, Россия); эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота (БиолоТ, Россия).

Результаты и обсуждение

Характеристика первичной суспензии клеток фетальной печени человека. Жизнеспособность свежeweделенных клеток фетальной печени человека ($n = 9$) в первичной суспензии составляла в среднем 95 %. Экспозиция клеток первичной суспензии с раствором ДМСО в течение 30 мин при 4 °С не приводила к снижению этого показателя. Для оценки наличия КОЕф в полученной суспензии часть клеток эксплантировали в монослойную культуру с посевной плотностью 20 000—40 000 клеток/см². В данных условиях в обеих исследованных группах было отмечено образование колоний фибробластоподобных клеток. Частота встречаемости КОЕф в первичной суспензии фетальной печени человека не отличалась от установленной нами ранее (Грищенко и др., 2005) и составляла 2—3 на 100 000 эксплантированных жизнеспособных клеток.

На 14-е сут в первичных культурах присутствовали также клетки гемопоэтического ряда, эпителиоидные клеточные элементы, единичные и в виде небольших очагов роста. При использовании более высоких посевных доз (200 000—400 000 клеток/см²) наблюдали рост преимущественно фибробластоподобных клеток. После субкультивирования в селективных условиях во всех культурах отмечен рост фибробластоподобных клеток на фоне элиминации гемопоэтических и эпителиальных элементов.

Исследование дифференцировочных потенциалов фибробластоподобных стромальных клеток фетальной печени человека. При 2-м пассировании данных культур клетки переводили в специальные среды для исследования остеогенных и адипогенных свойств стромальных КП фетальной печени человека ($n = 4$).

В настоящее время установлено, что при культивировании фибробластоподобных клеток КМ в остеогенной среде наблюдаются характерные изменения морфологии

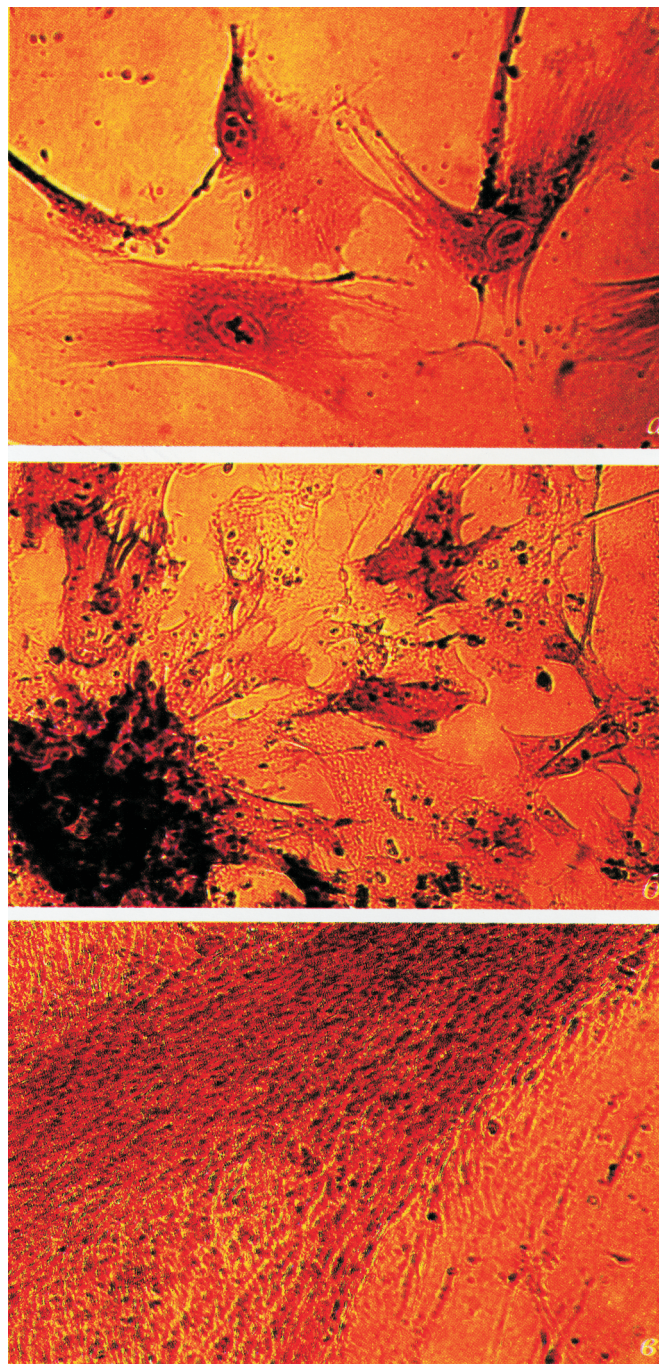


Рис. 1. Культуры фибробластоподобных клеток-предшественников, полученных из фетальной печени человека.

Культивирование в остеогенной (а, б) и адипогенной (в) средах, 19-е сут; а — окрашивание азуром—эозином, об. 25×, ок. 10×; б — окрашивание для выявления активности щелочной фосфатазы, об. 12.5×, ок. 10×; в — окрашивание специфическим для триглицеридов красителем Oil Red O для выявления внутриклеточного накопления нейтральных липидов, об. 4×, ок. 10×.

клеток (от веретеновидных фибробластов до кубоидальных остеобластов), которые сопровождаются экспрессией щелочной фосфатазы и совместно отражают начальные этапы остеогенной дифференцировки клеток в культуре (Bruder et al., 1997). В связи с этим в нашем исследовании была изучена индукция остеогенной дифференцировки фибробластоподобных клеток фетальной печени человека по данным морфофункциональным признакам.

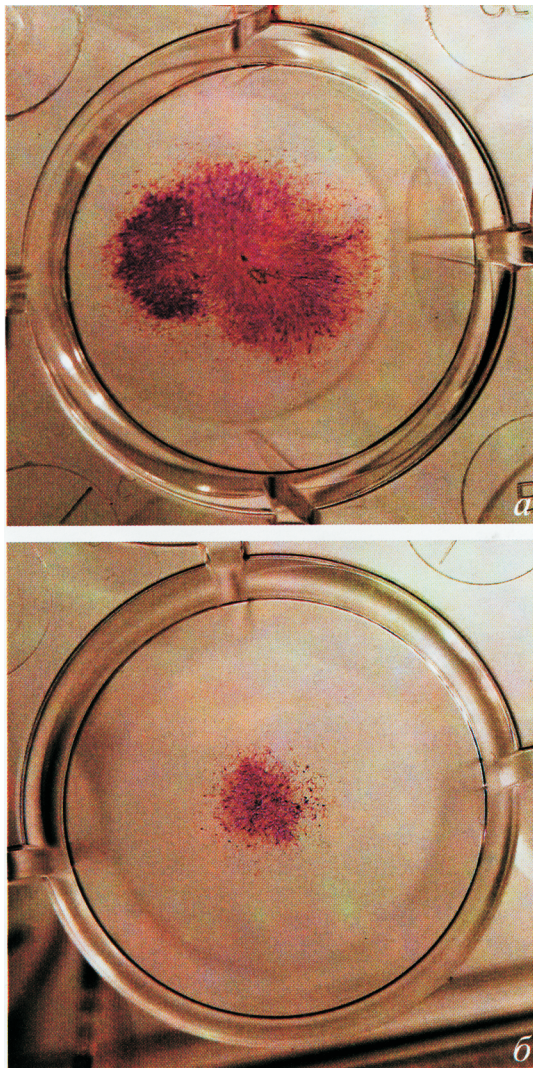


Рис. 2. Культуры фибробластоподобных клеток-предшественников фетальной печени человека в остеогенной среде, 19-е сут.

Клетки первичной суспензии, экспонированные с ДМСО (а) и не экспонированные с ДМСО (б), посеяны в монослойную культуру и после 2-го пассажа субкультивированы в остеогенной среде. Окрашивание клеток для выявления активности щелочной фосфатазы.

В контрольной группе (не экспонированных с ДМСО клеток) начиная с 5-х сут культивирования среди фибробластоподобных клеток выявлялись единичные клетки с остеобластической морфологией — полигональные и кубоидальные клеточные элементы с большим объемом цитоплазмы и округлым ядром, количество которых возрастало в течение всего периода наблюдения (рис. 1, а). На 19-е сут культивирования в среднем 40 % клеток были позитивными на щелочную фосфатазу (рис. 1, б). При этом в некоторых из исследованных культур отмечено присутствие остеокластов — макрофагов костной ткани. По всей видимости, после двукратного пассирования в «остеогенной» культуре сохранялись единичные гемопоэтические клетки, которые в данных условиях давали начало остеокластам. В то же время в контрольных культурах (на спонтанную дифференцировку) наблюдали типичные веретенновидные фибробластоподобные клетки, которые были негативными при окрашивании на щелочную фосфатазу. Таким образом, приведенные результаты

свидетельствовали о направленной (индуцированной) дифференцировке фибробластоподобных КП фетальной печени человека в остеогенном направлении в условиях *in vitro*.

При культивировании клеток контрольной группы в адипогенной среде наблюдали процессы пролиферации фибробластоподобных клеток. Уже к концу 1-й нед культивирования клетки формировали около 80 % конфлюэнтного монослоя. В течение всего срока наблюдения большинство клеток сохраняло морфологию фибробластов. Среди них встречались более крупные фибробластоподобные элементы с асимметрично закругленными краями, содержавшие капельные включения. На 19-е сут культивирования после фиксации и специфического окрашивания клеток были выявлены признаки адипогенной дифференцировки исследуемых КП. В этих культурах присутствовали клетки, которые содержали зернистые и мелкокапельные липидные внутриклеточные включения, позитивно окрашенные Oil Red O (рис. 1, в). В контрольных культурах на спонтанную адипогенную дифференцировку изменений морфологии фибробластоподобных клеток и позитивного окрашивания Oil Red O выявлено не было.

При культивировании клеток опытной группы (экспонированных с ДМСО) в остеогенной среде наблюдали процессы пролиферации фибробластоподобных клеток и признаки их индуцированной дифференцировки. На 19-е сут культивирования было установлено, что в данной культуре около 80 % клеток были позитивными по окрашиванию на щелочную фосфатазу (рис. 2, а), что вдвое выше по сравнению с аналогичным показателем в «остеогенной» культуре клеток контрольной группы (рис. 2, б). После окрашивания азуром—эозином дифференцировавшихся остеогенных КП отмечено, что кратковременный контакт клеток первичной суспензии с ДМСО не приводил впоследствии к появлению атипичных изменений в морфологии культивированных клеток.

При культивировании клеток опытной группы (экспонированных с ДМСО) в адипогенной среде исследуемые культуры достигали 90 % конфлюэнтного роста к 7—8-м сут культивирования. К моменту окончания эксперимента (19-е сут) клетки располагались плотно упакованным монослоем, а в некоторых участках формировали 2—3-слойные структуры. После окрашивания исследуемых культур Oil Red O, так же как в случае контрольной группы, было выявлено значительное количество клеток, позитивных на накопление нейтральных липидов. Однако быстрое формирование плотно упакованного монослоя затрудняло оценку изменений морфологии клеток, особенностей и различий в течение дифференцировочных процессов по сравнению с культурой клеток, не экспонированных с ДМСО (контрольная группа).

Спонтанных процессов остеогенной и адипогенной дифференцировок в опытной группе выявлено не было.

Полученные результаты по исследованию остеогенных и адипогенных потенциалов фибробластоподобных КП фетальной печени человека 8—11 нед гестации, несмотря на отличительные особенности в способах выделения и культивирования исследуемых клеток, согласуются с данными авторов работы (Campagnoli et al., 2001). Необходимо отметить, что по истечении времени, необходимого для индуцированной адипогенной дифференцировки (не менее 2 нед культивирования), на фоне активных процессов пролиферации фибробластоподобных КП фетальной

Список литературы

печени человека преобладали клетки с мелкокапельными липидными включениями, что свидетельствовало о начальных стадиях адипогенеза. Риден и соавторы (Ryden et al., 2003), сравнивая адипогенный потенциал стромальных КП, выделенных из фетальной печени человека и КМ взрослых доноров, описали менее интенсивные процессы индуцированной адипогенной дифференцировки в случае клеток фетальной печени. По мнению этих авторов, выявленные различия могли быть связаны как с присутствием в фетальной печени человека большего количества ранних предшественников, длительно сохраняющих способность дифференцироваться в другие типы клеток, так и с несовершенством условий культивирования, что обуславливает необходимость поиска эффективных факторов индуцированного адипогенеза для стромальных КП фетальной печени человека.

Данные о влиянии криопротектора ДМСО на дифференцировочные свойства фибробластоподобных КП в литературе практически отсутствуют, несмотря на то что это соединение традиционно применяется для криоконсервирования различных типов клеток, в том числе и МСК (Bruder et al., 1997; Lee et al., 2004). В настоящей работе свежeweделенные клетки фетальной печени человека инкубировали с ДМСО в условиях, которые используются в протоколах криоконсервирования клеточных суспензий. После экспозиции с ДМСО было установлено, что морфология адгезировавших клеток фетальной печени человека и их поведение в первичной культуре не изменялись. На основании результатов культивирования колониеобразующих фибробластоподобных клеток фетальной печени человека сделан вывод о том, что кратковременная экспозиция с 0.7 М раствором ДМСО в указанных условиях не приводит к нарушению процессов адгезии и пролиферации исследуемых стромальных КП. В то же время при последующем субкультивировании клеток опытной группы (экспонированных с ДМСО) выявлено, что количество фибробластоподобных КП, проявлявших способность к индуцированной остеогенной дифференцировке, увеличивалось в среднем на 40 %. В литературе имеются единичные сведения о влиянии ДМСО на дифференцировочные свойства стромальных предшественников КМ при культивировании *in vitro* (Woodburry et al., 2000). Авторы сообщили об участии ДМСО в составе культуральной среды в индукции нейронального фенотипа у МСК постнатального КМ. В нашей работе определено, что кратковременная экспозиция свежeweделенных клеток фетальной печени человека ДМСО в гипотермических условиях (4 °C) приводит к увеличению количества индуцибельных остеогенных КП при последующем культивировании.

Таким образом, в результате проведенного исследования получено подтверждение присутствия в первичной суспензии клеток фетальной печени человека ранних стромальных предшественников, способных к индуцированной в культуре остеогенной и адипогенной дифференцировке. Выявлено модифицирующее влияние криопротектора ДМСО на дифференцировочные свойства фибробластоподобных КП фетальной печени человека, в частности на примере индуцированной остеогенной дифференцировки *in vitro*. Установленный в работе факт влияния ДМСО на дифференцировочные потенциалы фетальных фибробластоподобных КП необходимо учитывать при разработке методов криоконсервирования стволовых клеток.

Горностаева С. Н., Ржанинова А. А., Гольдштейн Д. В. 2006. Миогенез в культуре мезенхимных стволовых клеток кроветворных тканей. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2 : 63—68.

Грищенко В. И., Петренко А. Ю., Волкова Н. А., Скоробогатова Н. Г. 2005. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток-предшественников из эмбриональной печени человека в условиях *in vitro*. Доповіди Національної академії наук України. 2 : 138—141.

Демидова С. А., Левина Д. С., Блюмкин В. Н., Мартынова В. Н., Мораль Т. Ф., Плешивцева В. В., Фадеева Л. Л. 1971. Методические указания по работе с клеточными культурами. М.: Ин-т вирусологии им. Д. И. Иванова АМН СССР. 25 с.

Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. 1977. Клеточные основы кроветворения. М.: Медицина. 272 с.

Bruder S. P., Jaiswal N., Haynesworth S. E. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J. Cell. Biochem. 64 : 278—294.

Campagnoli C., Roberts I. A. G., Kumar S., Bennett P. R., Bellantuono I., Fisk N. M. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood. 98 : 2396—2402.

Castro-Malaspina H., Gay R. E., Resnick G., Kapoor N., Meyers P., Chiarieri D., McKenzie S., Broxmeyer H. E., Moore M. A. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. Blood. 56 : 289—301.

Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 279 : 1528—1530.

Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. 3 : 393—403.

Friedenstein A., Chailakhjan R. K., Latzinik N. V., Panasyuk A. F., Keilis-Borok I. V. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and transplantation *in vivo*. Transplantation. 17 : 331—340.

Galmiche M. C., Koteliensky V. E., Briere J., Herve P., Charbord P. 1993. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. Blood. 82 : 66—76.

Hughes S. 2002. Cardiac stem cells. J. Pathol. 197 : 468—478.

In't Anker P. S., Noort W. A., Scherjon S. A., Kleijburg-van der Keur C., Kruisselbrink A. B., van Bezooijen R. L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H. H., Fibbe W. E. 2003. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. Haematologica. 88 : 845—852.

Kilrnan J. A. 1990. Histological and histochemical methods. Theory and practice. 2nd ed. Pergamon Press. 433 p.

Lee M. W., Choi J., Yang M. S., Moon Y. J., Park J. S., Kim H. C., Kim Y. J. 2004. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. Biochem. Biophys. Res. Commun. 320 : 273—278.

O'Donoghue K., Fisk N. M. 2004. Fetal stem cells. Best Practic Res. Clin. Obstet. Gynecol. 18 : 853—875.

Owen M. E., Cave J., Joyner C. J. 1987. Clonal analysis *in vitro* of osteogenic differentiation of marrow CFU-F. J. Cell Sci. 87 : 731—738.

Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marchak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 284 : 143—147.

Ryden M., Dicker A., Gotherstrom C., Astrom G., Tammik C., Arner P., Le Blanc K. 2003. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 311 : 391—397.

Van den Heuvel R. L., Versele S. R., Schoeters G. E., Vanderborcht O. L. 1987. Stromal stem cells (CFU-f) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice. *Br. J. Haematol.* 66 : 15—20.

Versele S. R., Van den Heuvel R. L., Schoeters G. E., Vanderborcht O. L. 1987. Proliferation activity of stromal stem cells

(CFU-f) from hemopoietic organs of pre- and postnatal mice. *Radiat Res.* 111 : 185—191.

Woodbury D., Schwarz E. J., Prockop D. J., Black I. B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61 : 364—370.

Поступила 17 V 2007

OSTEOGENIC AND ADIPOGENIC CAPACITY OF FIBROBLAST-LIKE PROGENITOR CELLS DERIVED FROM HUMAN FETAL LIVER

N. G. Skorobogatova,¹ N. A. Volkova, A. Yu. Petrenko

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

¹ e-mail: skorng@mail.ru

The study of differentiation potential of multipotent stromal progenitor cells (PCs) in embryogenesis is a crucial issue for understanding their biology and role in tissue regeneration of an adult organism. In this study in monolayer culture there were investigated osteogenic and adipogenic capacities of fibroblast-like PCs derived from human fetal liver of 8—11 gestation weeks before and after exposure to cryoprotectant dimethyl sulphoxide (DMSO). It was shown that the primary suspension of human fetal liver cells included immature stromal fibroblast-like PCs which were able to be induced into osteogenic and adipogenic differentiation. A short-time exposure of freshly isolated human fetal liver cells to cryoprotectant DMSO led to altering properties of the fibroblast-like PCs. Under subculture conditions, it was found an increase in the number of fibroblast-like PCs which were able to be induced to osteogenic differentiation *in vitro*. The established fact of DMSO influence on the differentiation capacity of fetal fibroblast-like PCs is necessary to take into consideration while developing cryopreservation methods for stem cells.

Key words: fibroblast-like progenitor cells, human fetal liver, cell culture, osteogenic and adipogenic differentiation, DMSO.