

**Использование двухуровневой системы культивирования для селекции
клеток с адипогенным потенциалом**

Черноруцкий Михаил Витальевич

Студент (специалист)

Тверская государственная медицинская академия, Тверская область, Россия

E-mail: p001637@mail.ru

Жировая ткань является источником мезенхимальных стромальных клеток (МСК), преадипоцитов и зрелых адипоцитов для первичных клеточных культур. Ряд методик "потолочного" культивирования [1,2] позволяет одновременно разделять эти клеточные фракции, однако сопряжен с целым рядом ограничений: методы требуют значительного количества биологического материала, большого расхода питательных сред, ограничивают одновременную закладку нескольких опытных серий. Эти технические недостатки предлагается устранять оригинальным методом двухуровневого культивирования, опробованным в данной работе.

Удобной системой для первичной селекции клеток жировой ткани оказались ячейки планшета, закрытые покровными стеклами. Метод опробован при культивировании клеток, выделенных из жировой ткани мышей и крыс, в средах DMEM с 10% FBS, а также DMEM:F12 (1:1) с 10% FBS в 24-луночном планшете. Ячейки заполняли средой доверху и покрывали стерильными покровными стеклами так, чтобы в питательном растворе не оставалось пузырьков воздуха. Наблюдение за "потолочной" культурой проводилось с помощью микроскопа с прямой оптической схемой, осмотр дна планшета - через инвертированный микроскоп. Контроль за прикреплением клеток к стеклам производился путем окрашивания по Романовскому-Гимза. Глубину адипогенной дифференцировки оценивали в ходе окрашивания Oil Red O. Предлагаемый метод позволяет: 1) применять гравитационную седиментацию для эффективного выделения МСК, существенная часть которых может выбрасываться при традиционной методике [3] с флотирующей фракцией; 2) выражено снизить лизис адипоцитов, оставшихся флотирующими при посадке МСК; 3) избавляться от лизирующихся адипоцитов путем смены стекол без замены среды, сохраняя тем самым накопившиеся в среде ростовые факторы; 4) легко и быстро оперировать прикрепившимися к покровному стеклу зрелыми адипоцитами с целью их изоляции, очистки, пересадки и т.д.; 5) продолжать селекцию дифференцирующихся в адипоциты клеток-предшественников «донного» уровня, при спонтанном откреплении учитывать флотировавшие клетки, сохранять их живыми на покровном стекле и тем самым расширить возможности изучения адипогенной дифференцировки в популяции.

Данный подход может служить модификацией методов выделения из жировой ткани МСК и зрелых адипоцитов для первичного культивирования, а также селекции клеток, накапливающих жир при культивировании.

Источники и литература

- 1) Chen J, Dodson MV, Jiang Z. Cellular and molecular comparison of redifferentiation of intramuscular- and visceral-adipocyte derived progeny cells // Int. J. Biol. Sci. 2010. V. 6, N. 1. P. 80-88.
- 2) Zhang HH, Kumar S, Barnett AH et al. Ceiling culture of mature human adipocytes: use in studies of adipocyte functions // J. Endocrinol. 2000. V. 164, N. 2. P. 119-128.
- 3) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // Mol. Biol. Cell. 2002. V. 13, N. 12. P. 4279-4295.