

Обогащение суспензии гепатоцитов эмбриона человека CD34-положительными клетками при культивировании

О.В. МАРКОВА

Институт нейрохирургии имени акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев

Enrichment of Hepatocyte Suspension of Human Embryo with CD34-Positive Cells During Culturing

O.V. MARKOVA

A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Разработаны методы культивирования и экспансии *ex vivo* стволовых клеток с помощью коммерческих ростовых факторов. Важное значение имеет получение ростовых факторов из доступных биологических источников.

Цель работы – исследование возможности обогащения суспензии гепатоцитов эмбриона человека CD34-положительными клетками при культивировании в присутствии лизата нейроцитов эмбриона человека.

Лизат нейроцитов эмбриона человека (7–8 недель гестации) получали многократным замораживанием и размораживанием клеточной суспензии. Стандартизировали лизат по содержанию белка (160 мг/мл). Лизат добавляли в полную среду ДМЕМ (10% от общего объема среды). Гепатоциты эмбриона человека 7–8 недель гестации культивировали в бессывороточной среде ДМЕМ 5 суток для избавления суспензии от зрелых клеток и увеличения удельного веса CD34-положительных клеток. Затем вносили полную среду ДМЕМ, содержащую 10% лизата нейроцитов человека, и инкубировали суспензию в течение 7 суток. Определяли общее количество клеток, удельный вес жизнеспособных клеток (окраска 0,2% раствором трипанового синего), содержание CD34-положительных клеток (метод проточной цитофлуориметрии).

Установлено, что культивирование гепатоцитов эмбриона человека в бессывороточной среде ДМЕМ (5 суток) с последующим переводом культуры на полную среду ДМЕМ, содержащую 10% лизата нейроцитов эмбриона человека (7 суток), сопровождается увеличением клеточности суспензии, удельного веса жизнеспособных клеток, а также CD34-положительных клеток.

Предложен метод обогащения суспензии гепатоцитов эмбриона человека CD34-положительными клетками при культивировании в присутствии лизата нейроцитов эмбриона человека. Вероятно, лизат эмбриональных нейроцитов содержит ростовые факторы для стволовых гемопоэтических клеток.

The methods of culturing and *ex vivo* expansion of stem cells with commercial growth factors have been developed. The deriving of growth factors from accessible biological sources is of a significant importance.

The research aim was to study the enrichment capacity of hepatocyte suspension of human embryo with CD34-positive cells during culturing in the presence of human embryo neural cell lysate.

The lysate of human embryo neural cells (7–8 weeks of gestation) was derived by multiple freezing and thawing of cell suspension. The lysate was standardized on the protein content (160 mg/ml). The lysate was added into complete DMEM medium (10% of total medium volume). The hepatocytes of human embryo of 7–8 weeks gestation were cultured in DMEM serum-free medium for 5 days for the elimination of mature cells from the suspension and increasing of specific weight of CD34-positive cells. Then the complete DMEM medium, containing 10% lysate of human neuro-cells, was added and the suspension was incubated for 7 days. The total number of cells, specific weight of viable cells (0.2% solution of trypan blue staining), content of CD34-positive cells (the flow cytometry method) were determined.

It has been established, that the culturing of human embryo hepatocytes in DMEM serum-free medium (5 days) with following transfer of culture into complete DMEM medium, containing 10% lysate of human embryo neuro-cells (7 days) is accompanied by increasing of suspension cellularity, specific weight of viable cells, and CD34-positive cells.

The enrichment method for the suspension of human embryo hepatocytes with CD34-positive cells at culturing in the presence of lysate of human embryo neuro-cells has been suggested. Probably, the lysate of embryo neuro-cells contains the growth factors for hemopoietic stem cells.