

УДК 576.3+612.014.2/3

Р.Г. Васильев<sup>1,2\*</sup>

## Клональная мультипотентность стволовых/прогениторных клеток – производных нервного гребня из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых млекопитающих<sup>#</sup>

UDC 576.3+612.014.2/3

R.G. Vasyliiev<sup>1,2\*</sup>

### Clonal Multipotency of Neural Crest-Derived Stem/Progenitor Cells from Bulge Region of Adult Mammal Hair Follicle<sup>#</sup>

**Ключевые слова:** нервный гребень, мультипотентные стволовые/прогениторные клетки, мультилинейная дифференцировка.

**Ключові слова:** нервовий гребінь, мультипотентні стовбурові/прогениторні клітини, мультилінійне диференціювання.

**Key words:** neural crest, multipotent stem/progenitor cells, multilineage differentiation.

В последнее десятилетие из различных источников взрослого организма млекопитающих (тканей и органов) выделены мультипотентные стволовые клетки – производные нервного гребня (МСК-ПНГ) [4–6, 8, 9], их характерной особенностью является способность к направленной дифференцировке в меланоциты, «нейральные» (нейроны и глия) и «мезенхимальные» клеточные типы.

Для МСК-ПНГ из большинства источников способность к «мезенхимальной» дифференцировке показана только в направлении миофибробластов и/или гладкомышечных клеток. Наиболее широкий дифференцировочный потенциал был определен у постнатальных МСК-ПНГ из бульбарного региона волосяного фолликула: нейроны, Шванновские клетки, меланоциты, гладкомышечные клетки и хондроциты [8]. В работах других авторов была показана их способность к дифференцировке в адипоциты и остеобласты [1, 3], однако способность к дифференцировке в «мезенхимальные» и «нейрональные» клеточные типы не была показана на клональном уровне.

Цель данной работы заключалась в исследовании способности клональных культур МСК-ПНГ к дифференцировке в «мезенхимальные» и «нейрональные» клеточные типы.

During the recent decade a variety of adult mammal sources (tissues and organs) were used to procure neural crest-derived multipotent stem cells (NCD-MSCs) [4–6, 8, 9], which feature was the ability to directed differentiation into melanocytes, ‘neural’ (neurons and glia) and ‘mesenchymal’ cell types .

The ‘mesenchymal’ differentiation of NCD-MSCs from most sources was found to yield only myofibroblasts and/or smooth muscle cells. The widest differentiation potential has been revealed in the postnatal NCD-MSCs from the hair follicle bulge region: *i.e.* neurons, Schwann cells, melanocytes, smooth muscle cells and chondrocytes [8]. Their ability to differentiate into adipocytes and osteoblasts was also reported [1, 3], but the ability to differentiate into ‘mesenchymal’ and ‘neuronal’ cell types was not shown at the clonal level so far.

The aim of this study was to estimate the ability of NCD-MSC clonal cultures to differentiate into ‘mesenchymal’ and ‘neuronal’ cell types.

The experiments were performed in cell cultures derived from 4 month-old male FVB mice in compliance with the bioethical principles and biosafety regulations, as confirmed by the Bioethics committee of the Institute

<sup>1</sup>ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», г. Киев, Украина

<sup>2</sup>Биотехнологическая лаборатория ilaya regeneration, Медицинская компания ilaya, г. Киев, Украина

**\*Адрес для корреспонденции:**

ул. Вышгородская, 67, г. Киев, Украина 04114;  
электронная почта: rvasiliev@ukr.net

<sup>1</sup>Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

<sup>2</sup>Biotechnological Laboratory ilaya regeneration, Medical Company ilaya, Kiev, Ukraine

**\*Address for correspondence:**

67, Vyshgorodskaya str., Kiev, Ukraine 04414  
e-mail: rvasiliev@ukr.net

<sup>#</sup>Данное исследование было представлено на минисимпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 24 мая 2013 года в г. Киеве.

<sup>#</sup>This reseach was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24<sup>th</sup> of May, 2013.

Поступила 15.06.2013

Принята в печать 30.08.2013

Received June, 15, 2013

Accepted August, 30, 2013

Эксперименты были выполнены на клеточных культурах, полученных от самцов мышей линии FVB 4-месячного возраста, с соблюдением принципов биоэтики и норм биологической безопасности, что подтверждено заключением комиссии по биоэтике ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины».

Культуру МСК-ПНГ получали из эксплантатов бульбарного региона (БР) волосяного фолликула (ВФ) вибрисс по методу M. Sieber-Blum [8] в нашей модификации [2]. Всего в работе было исследовано 3 культуры от различных доноров. Для получения первичных и клональных культур, а также направленной дифференцировки использовали культуральную посуду, предварительно покрытую коллагеном I типа (за исключением дифференцировки в нейрональном направлении, при которой в качестве субстрата применяли поли-L-лизин).

*Получение клональных культур МСК-ПНГ.* По 100 клеток из культуры первого пассажа МСК-ПНГ засеивали в чашки Петри 100 мм и культивировали 14 суток в среде следующего состава: DMEM/F12 с 20% ЭТС, 1% витаминов MEM, 2% питательной добавки «Neuronal Stem Cell Supplement» («PAA», Австрия), 2% питательной добавки ITS («Becton Dickinson», США) 10 нг/мл bFGF и 2 мМ глутамин. Для получения клональных культур отбирали колонии, содержащие более 100 клеток (в среднем ~500–1000 клеток), и пересевали при помощи клонирующих цилиндров («Sigma», США) в культуральный флакон T-25 (по 3 клона от каждого донора).

*Направленную дифференцировку в адипогенном и остеогенном направлениях* осуществляли по общепринятым протоколам [7] с последующей оценкой цитохимическим методом (окрашивание Oil Red O и Alizarin Red S соответственно).

*Направленную дифференцировку в нейрональном направлении* осуществляли в среде следующего состава: «Neuronal Base Medium P» («PAA»), 10% экстракта мышиноного головного мозга, 1% «Neuronal Stem Cell Supplement», 2% питательной добавки «NeuroMix» («PAA»), 2 мкМ ретиноевой кислоты («Sigma»), 5 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF («Sigma»). Длительность дифференцировки – 11 дней.

*Направленную дифференцировку в глиальном направлении* (Шванновские клетки) осуществляли в среде следующего состава: «Neuronal Base Medium P», 10% экстракта мышиноного головного мозга, 1% «Neuronal Stem Cell Supplement», 2 мкМ ретиноевой кислоты, 100 нМ изопротеренола («Sigma») 5 нг/мл bFGF и 40 нг/мл EGF. Длительность дифференцировки – 11 дней.

*Иммуноцитохимия.* Для детекции нейрональной дифференцировки использовали первичные мышинные anti- $\beta$ -III-tubulin (TU-20) моноклональные антитела (1:500, «Abcam», Великобритания) и вторичные козы

of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

*The culture of NCD-MSCs* was obtained from the bulge region (BR) explants of whisker hair follicle (HF) according to method of Sieber-Blum *et al.* [8] in our modification [2]. The investigation involved three cultures from different donors. Primary and clonal culturing and directed differentiation was performed in culture labware pre-coated with type I collagen (except neuronal differentiation, where the substrate was poly-L-lysine).

*Obtaining of NCD-MSC clonal cultures.* Hundred cells from the first passage NCD-MSC culture were seeded in each 100 mm Petri dish and cultured thereafter during 14 days in DMEM/F12 medium supplemented with 20% FBS, 1% MEM vitamins, 2% Neuronal Stem Cell Supplement (PAA, Austria), 2% ITS (Becton Dickinson, USA), 10 ng/ml bFGF, and 2 mM of glutamine. To perform cloning the colonies containing more than 100 cells were selected (in average ~500–1,000 cells) and passaged using cloning cylinders (Sigma, USA) in culture flasks T25 (3 clones from each donor).

*Directed differentiation into adipogenic and osteogenic lineages* was carried-out according conventional protocols [7], and confirmed cytochemically (Oil Red O and Alizarin Red S staining, respectively).

*Directed differentiation into neuronal lineage* was performed in Neuronal Base Medium P (PAA) supplemented with 10% of murine brain extract, 1% Neuronal Stem Cell Supplement, 2% NeuroMix (PAA), 2  $\mu$ M retinoic acid (Sigma), 5 ng/ml bFGF, and 20 ng/ml EGF (Sigma). The differentiation lasted 11 days.

*Directed glial differentiation* (Schwann cells) was carried-out in Neuronal Base Medium P supplemented with 10% murine brain extract, 1% Neuronal Stem Cell Supplement, 2  $\mu$ M retinoic acid, 100 nM isoproterenol (Sigma), 5 ng/ml bFGF, and 40 ng/ml EGF. The differentiation lasted 11 days.

*Immunocytochemistry.* Neuronal differentiation was revealed using primary mouse anti- $\beta$ -III-tubulin (TU-20) monoclonal antibodies (1:500, Abcam, UK) and secondary goat anti-mouse FITC-conjugated antibodies (1:2000, Abcam). Differentiation into Schwann cells was found using primary mouse anti-S-100 monoclonal antibodies (1:500, Abcam) and secondary goat anti-mouse FITC-conjugated antibodies (1:2000, Abcam). The antibodies were kindly provided by Dr. Galina Bozhok from the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine (Kharkiv).

The cell nuclei were stained with propidium iodide (2  $\mu$ g/ml).

*Intravital microscopy and cytological study* of specimens were performed using inverted fluorescent microscope Axio Observer A1, equipped with a digital camera AxioCam ERc 5s, ZEN 2012 and AxioVision 4.8 software as well as fluorescence filter set 77 (FITC and PI) (all by Carl Zeiss, Germany).



anti-mouse FITC-конъюгированные антитела (1:2000, «Abcam»). Для обнаружения дифференцировки в Шванновские клетки использовали первичные мышинные anti-S-100 моноклональные антитела (1:500, «Abcam») и вторичные козы anti-mouse FITC-конъюгированные антитела (1:2000, «Abcam»). Антитела были любезно предоставлены ст.н.с. Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков) Г.А. Божок.

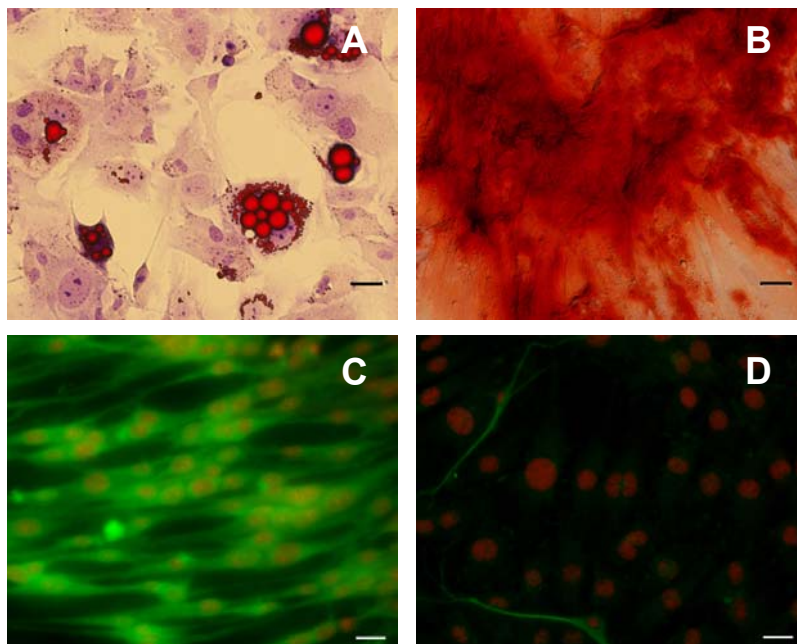
Ядра клеток окрашивали раствором пропидиума йодида (2 мкг/мл).

Прижизненную микроскопию и исследование цитологических препаратов проводили при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа «Axio Observer A1», оснащенного цифровой камерой «AxioCam ERc 5s», программного обеспечения «ZEN 2012» и «AxioVision 4.8», а также набора фильтров для флуоресценции №77 (FITC и PI) (все – «Carl Zeiss», Германия).

Проведенные исследования позволили обнаружить, что эмиграция и активная пролиферация фибробластоидных клеток начинались на 2–4-е сутки культивирования из всех эксплантированных БР ВФ. На 10-е сутки культивирования эксплантаты удаляли и клетки пересеивали во флакон Т-25. При достижении культурой субконфлуентного состояния клетки снимали и использовали для получения клональных культур.

Из всех ( $n = 9$ ) отобранных колоний удалось успешно получить клональные культуры с достаточным для дальнейших экспериментов количеством клеток.

При культивировании клональных культур фибробластоидных клеток из БР ВФ в соответствующих индуктивных дифференцировочных средах с клетками происходили морфологические и функциональные изменения, характерные для данного направления дифференцировки. Так, при культивировании в адипоиндуктивной среде клетки приобретали округло-полигональную форму, в цитоплазме появлялись мелкие липидные вакуоли, которые со временем увеличивались в размерах и окрашивались красителем Oil Red O (рисунок, А). При культивировании в остеоиндуктивной среде клетки приобретали полигональную форму и начинали продуцировать кальцифицированный внеклеточный матрикс, который окрашивался красителем Alizarin Red S (рисунок, В). Направленная



Направленная дифференцировка клональных культур МСК-ПНГ: **А** – адипогенная дифференцировка; окрашивание Oil Red O, контрастирование по Романовскому; светлополюсная микроскопия в проходящем свете, масштабный отрезок – 50 мкм; **В** – остеогенная дифференцировка; окрашивание Alizarin Red S, светлополюсная микроскопия в проходящем свете, масштабный отрезок – 50 мкм; **С** – дифференцировка в глиальном направлении (Шванновские клетки), экспрессия клетками специфического для глии белка S-100, флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок – 20 мкм; **Д** – дифференцировка в нейрональном направлении, экспрессия клетками нейрон-специфического белка  $\beta$ -III-тубулина; флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок – 20 мкм.

Directed differentiation of NCD-MSC clonal cultures: **A** – adipogenic differentiation; Oil Red O staining, counterstaining according to Romanowsky; bright field transmitted light microscopy, bar 50  $\mu$ m; **B** – osteogenic differentiation; Alizarin Red S staining, bright field transmitted light microscopy, bar 50  $\mu$ m; **C** – glial differentiation (Schwann cells), expression of glial specific protein S-100, fluorescent microscopy, bar 20  $\mu$ m; **D** – neuronal differentiation, expression of neuron specific protein  $\beta$ -III-tubulin; fluorescent microscopy, bar 20  $\mu$ m.

The research revealed that the emigration and active proliferation of fibroblastoid cells started to 2–4<sup>th</sup> culture days in all explanted HF BR. To the 10<sup>th</sup> day of culture the explants were removed and the cells were passaged in T-25 flask. After the culture reached the subconfluency the cells were detached and used for obtaining clonal cultures.

All the selected colonies ( $n = 9$ ) successfully developed the clones with cell amount sufficient for further experiments.

Clonal culture of fibroblastic cells derived from HF BR in appropriate differentiation media resulted in morphological and functional changes observed in the cells which were specific to the chosen direction of differentiation. In particular, the cells cultured in adipoinductive medium were of rounded polygonal shape, their cytoplasm acquired small lipid vacuoles, their size increased eventually and staining with dye Oil Red O was positive (Figure A). The cells cultured in osteoinductive medium became polygonal and started producing calcified extracellular matrix, positively stained with Alizarin Red S



дифференцировка в «нейральные» клеточные типы также приводила к характерным морфологическим изменениям и экспрессии специфических для нейронов и глиальных (Шванновских) клеток белков. Так, при направленной дифференцировке в нейроны фибробластоидные клетки трансформировались в клетки с округлой фазо-яркой сомой и длинными отростками, которые позитивно окрашивались на  $\beta$ -III-тубулин (рисунок, С). Культивируемые в индуктивной для глиальной дифференцировки среде клетки приобретали характерную для Шванновских клеток морфологию и экспрессировали специфический для глии белок S-100 (рисунок, D).

Таким образом, в данной работе на клональных культурах показано существование в бульбарном регионе волосяного фолликула взрослых животных мультипотентных стволовых/прогениторных клеток – производных нервного гребня, обладающих способностью к дифференцировке как в «мезенхимальные», так и в «нейрональные» клеточные типы.

### Литература

1. Васильев Р.Г. Мультипотентные стволовые клетки из бульбарного региона волосяного фолликула со свойствами производных нервного гребня // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №2. – С. 165–168.
2. Патент №66086 Украина, МПК С 12 N 5/00. Способ культивирования мультипотентных стволовых клеток – производных нервного гребня из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых млекопитающих / Р.Г. Васильев, А.Е. Родниченко, И.Ф. Лабунец, Г.М. Бутенко; № U 2011 06227; заявл. 18.05.2011; опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.
3. Clewes O., Narytnyk A., Gillender K. et al. Human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC) – characterization and directed differentiation into osteocytes and melanocytes // Stem Cell Rev. – 2011. – Vol. 7, №4. – P. 799–814.
4. Hunt D., Sajic M., Phillips H. et al. Origins of gliogenic stem cell populations within adult skin and bone marrow // Stem Cells Dev. – 2010. – Vol. 19, №7. – P. 1055–1065.
5. Janebodin K., Horst O.V., Ieronimakis N. et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, №11. – e27526.
6. Kruger G.M., Mosher J.T., Bixby S. et al. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness // Neuron. – 2002. – Vol. 35, №4. – P. 657–669.
7. Prockop D.J., Phinney D.G., Bunnell B.A. Mesenchymal stem cells: methods and protocols. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – 192 p.
8. Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y. et al. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle // Dev. Dyn. – 2004. – Vol. 231, №2. – P. 258–269.
9. Tomita Y., Matsumura K., Wakamatsu Y. et al. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart // J. Cell Biol. – 2005. – Vol. 170, №7. – P. 1135–1146.

(Figure B). Directed differentiation into ‘neural’ cell types also led to appearance of characteristic morphological changes and expression of proteins specific for neuronal and glial (Schwann) cells. Specifically, during directed differentiation into neurons the fibroblastoids transformed into cells with a rounded phase-bright soma and long processes positively stained for  $\beta$ -III-tubulin (Figure C). The cells cultured in the glial inductive medium acquired the morphology characteristic for Schwann cells and expressed glial-specific protein S-100 (Figure D).

Collectively, the studies performed in clonal culture allowed to reveal the existence of neural crest-derived multipotent stem/progenitor cells in the bulbar region of the adult animals hair follicle, which possessed the ability to differentiate into ‘mesenchymal’ and ‘neuronal’ cell types.

### References

1. Vasyliiev R.G. Multipotent stem cells of bulbar region of hair follicle with properties of neural crest derivatives // Problems of Cryobiology. – 2012. – Vol. 22, N2. – P. 165–168.
2. Patent N66086 Ukraine, IPC C 12 N 5/00. Method of cultivation of neural crest-derived mesenchymal stem cells from bulbar region of adult mammal hair follicle / R.G. Vasyliiev, A.Ye. Rodnichenko, I.F. Labunets, G.M. Butenko; Nr. U 2011 06227; Filed 18.05.2011; Published 26.12.2011, Bulletin N24.
3. Clewes O., Narytnyk A., Gillender K. et al. Human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC) – characterization and directed differentiation into osteocytes and melanocytes // Stem Cell Rev. – 2011. – Vol. 7, N4. – P. 799–814.
4. Hunt D., Sajic M., Phillips H. et al. Origins of gliogenic stem cell populations within adult skin and bone marrow // Stem Cells Dev. – 2010. – Vol. 19, N7. – P. 1055–1065.
5. Janebodin K., Horst O.V., Ieronimakis N. et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N11. – e27526.
6. Kruger G.M., Mosher J.T., Bixby S. et al. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness // Neuron. – 2002. – Vol. 35, N4. – P. 657–669.
7. Prockop D.J., Phinney D.G., Bunnell B.A. Mesenchymal stem cells: methods and protocols. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – 192 p.
8. Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y. et al. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle // Dev. Dyn. – 2004. – Vol. 231, N2. – P. 258–269.
9. Tomita Y., Matsumura K., Wakamatsu Y. et al. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart // J. Cell Biol. – 2005. – Vol. 170, N7. – P. 1135–1146.

