

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



УДК 576.3/7:616-008.847.9-008.9

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

Р. В. Салютін, К. М. Запольська, С. С. Паляниця, В. М. Сірман, М. Ф. Соколов

Координаційний центр трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України,
Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України, м. Київ

DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS OF ADIPOSE TISSUE

R. V. Salyutin, K. M. Zapohlska, S. S. Palyanytsya, V. M. Sirman, M. F. Sokolov

Дослідження стовбурових клітин є одним з найперспективніших напрямків сучасної науки і практики. "Класичним" джерелом стовбурових клітин є кістковий мозок, який містить значну кількість ММСК. Саме клітини кісткового мозку вперше використані в клінічній практиці, їх широко застосовують, особливо при лікуванні онкогематологічних захворювань [1, 2].

Проте, незважаючи на значні переваги ММСК, їх широке клінічне використання обмежене, що зумовлює необхідність пошуку альтернативних джерел стовбурових клітин [3].

В останні роки як альтернативне та безпечне джерело стовбурових клітин використовують жирову тканину. Результати досліджень свідчать, що в одиниці об'єму жирової тканини міститься значна кількість стовбурових клітин, отримання їх культури досить просте, економічно вигідне, це безболісна й безпечна для пацієнта маніпуляція [4].

Доцільність використання стовбурових клітин, виділених з жирової тканини, в реконструктивно—пластичній та естетичній хірургії зумовлена їх здатністю захищати від тканинної резорбції пересажену шляхом ліпофілінгу аутологічну жирову тканину [5].

Можливість використання стовбурових клітин, виділених з жирової

Реферат

Проведене експериментальне дослідження з метою визначення можливості диференціювання стовбурових клітин, виділених з жирової тканини, за адипогенним напрямком. Результати дослідження свідчили, що клітини, виділені з жирової тканини, здатні до специфічного диференціювання в остеогенному, хондрогенному, а головне — адипогенному напрямку, що підтверджує мультипотентність мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини. Жирова тканина є альтернативним кістковому мозку джерелом мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (ММСК), які можуть бути застосовані у подальших дослідженнях з визначення можливості їх використання для захисту пересаженої шляхом ліпофілінгу аутологічної жирової тканини від тканинної резорбції.

Ключові слова: жирова тканина; стовбурові клітини; диференціація; експеримент.

Abstract

Experimental investigation were conducted with the objective to determine a stem cells, capacity to differentiate in adipogenic direction, if they were obtained from adipose tissue. The investigation results have witnessed, that the cells, obtained from adipose tissue, are capable for a tissue—specific differentiation in osteogenic, chondrogenic, and, principally — in adipogenic direction, what confirms a multipotent nature of mesenchymal stem cells of adipose tissue. Adipose tissue constitutes an alternative to the bone marrow, as a source of multipotent mesenchymal stem cells, which may be applied in further investigations, concerning determination of their defense possibility for the transplanted autologous adipose tissue from the tissue resorption, made in a lipophilizing way.

Key words: adipose tissue; stem cells; differentiation; experiment.

тканини, ґрунтується на припущенні, що, введені з ліпоаспіратом, клітини мають мультипотентну природу та почнуть диференціюватися за адипогенним напрямком, збільшуючи їх популяцію та, як наслідок, масу й об'єм трансплантованого графта.

Мета роботи: оцінити можливість і потенціал (мультипотентність) диференціювання стовбурових клітин, виділених з жирової тканини.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для отримання первинного біологічного матеріалу (жирової тканини) використовували мишей ліній FVB—Cg—Tg(GFPU)5Nagy/J (трансгенні по GFP), масою тіла 25—30 г, віком у середньому (3 ± 0,4) міс, яких утримували при кімнатній температурі, на звичайному лабораторному раціоні в умовах віварію Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України.

Після евтаназії з пахвинних ділянок тварин виділяли фрагменти підшкірного прошарку, після оброблення яких отримували суспензію клітин. Після фільтрування суспензії клітин через клітинний фільтр з діаметром пор 70 мкм її переносили в культуральні флакони з повним живильним середовищем з розрахунку $0,12-0,15 \times 10^6$ клітин в 1 см^2 культуральної поверхні.

Зразки культивували у стандартних умовах в CO_2 -інкубаторі при температурі 37°C та зволоженої атмосфері з концентрацією CO_2 5%. Субкультивування проводили при досягненні культурою 80–90% конфлюентності моношару. Суспензію клітин збирали і центрифугували протягом 5 хв при 200 об./хв, отримували культуру стовбурових клітин.

ММСК, виділені з кісткового мозку, мають мультіпотентні властивості, здатні до диференціювання за адипогенним, ходроногенним та остеогенним напрямками [6].

З метою визначення мультіпотентних властивостей клітин, виділених з жирової тканини, вивчали їх спрямоване диференціювання в адипогенному, ходроногенному та остеогенному напрямках за умови *in vitro*.

Адипогенне диференціювання відбувалося при висіванні клітин, виділених з жирової тканини, в 6-лунковий планшет в концентрації 5×10^3 в 1 см^2 .

Через 24 год робоче живильне середовище замінювали на диференціовальне живильне середовище, що складалось з DMEM—LG, 10% FBS, 1% антибіотика (цефтріаксон), 50 мкмоль індометацину, 1 мкмоль дексаметазону, 0,5 ммоль IBMX.

Диференціовальне живильне середовище замінювали через кожні 72 год протягом 28 діб.

Протягом цього періоду спостерігали зміни активності проліферації клітин, їх морфології, відзначали інтервали змін характеристик культури.

Через різні проміжки часу (до 21—ї доби культивування) моношар клітин промивали PBS, фіксували 2% охолодженим розчином формальдегіду протягом 25 — 30 хв, повтор-

но промивали PBS. Фіксований моношар клітин фарбували Oil Red O, гематоксиліном та еозіном.

Диференціювання отриманих клітин в остеогенному та ходроногенному напрямках індукували за модифікованими методиками Li та співавторів (2009), Matsuda та співавторів (2005).

Для спрямованого остеогенного диференціювання клітини культивували протягом 2 — 3 пасажив, на стадії субконфлюентного моношару замінювали живильне середовище для культивування на остеоіндуктивне, яке складалось з живильного середовища DMEM—F12 (Sigma, США) з додаванням 7% FBS, L—аскорбінової кислоти 2—фосфату (0,05 ммоль), дексаметазону (100 нмоль) та β —гліцерофосфату (10 ммоль).

Це середовище замінювали через кожні 3 — 4 доби. Загалом клітини перебували у середовищі для остеогенного диференціювання протягом 28 діб за стандартних умов культивування. Протягом цього періоду спостерігали зміни активності проліферації клітин, їх морфології, відзначали інтервали змін характеристик культури.

Через різні проміжки часу (до 21—ї доби культивування) моношар клітин промивали PBS, фіксували 2% охолодженим розчином формальдегіду протягом 25 — 30 хв, повторно промивали PBS.

Фіксований моношар клітин фарбували алізариним червоним та за методом фон Косса для виявлення відкладень солей кальцію в позаклітинному матриксі, що є однією з ознак остеогенного диференціювання культури.

Для виявлення експресії лужної фосфатази, яка також є маркером остеогенного диференціювання клітин, на фіксований моношар наносили розчин BCIP/NBT (Sigma, США) на 20 — 30 хв у захищеному від світла місці, відмивали дистильованою водою та оцінювали інтенсивність забарвлення.

Для ходроногенного диференціювання клітини культивували протягом 2 — 3 пасажив, на стадії конфлюентного моношару замінювали живильне середовище для культиву-

вання на середовище для ходроногенного диференціювання, яке складалось з живильного середовища DMEM—HG (Sigma, США) з додаванням 7% FBS, L—аскорбінової кислоти 2—фосфату (50 мкг/мл), дексаметазону (39 нг/мл), натрію пірувату (100 мкг/мл), трансформуючого фактор росту— β_3 (TGF— β_3 10 нг/мл) та інсуліноподібного фактор росту I (IGF—I 100 нг/мл).

Тривалість перебування клітин у ходроногенному середовищі та умови культивування аналогічні таким за остеогенного та адипогенного диференціювання клітин. Фіксований моношар клітин фарбували за методикою для виявлення агрекану та колагену II типу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження свідчили про наявність в отриманій шляхом оброблення жирової тканини культурі клітин 3 субпопуляцій клітин.

Клітини діаметром 10 — 15 мкм, веретеноподібної форми, з чітко визначеним ядром і гомогенною цитоплазмою становили першу субпопуляцію.

Клітини другої субпопуляції діаметром до 40 мкм, округлої форми, з витягнутим цитоплазматичним відростком, темним ядром, зміщеним до краю клітини, гетерогенною цитоплазмою та підвищеною гранулярністю в ділянці ядра.

Клітини третьої субпопуляції діаметром до 80 мкм, містили значну кількість вакуолей та гранул, переважали в культурі клітин. Вони характеризувалися високою адгезивністю, колонієутворенням, здатністю проліферувати в культурі більш ніж 72 рази.

Саме клітини третьої субпопуляції були використані для подальших експериментальних досліджень, визначення напрямків диференціювання клітин.

Результати експерименту свідчили, що при культивуванні клітин третьої субпопуляції в остеогенному середовищі спостерігали активацію процесу остеодиференціювання.

Перші ознаки остеодиференціювання фіксували наприкінці першо-

го тижня експерименту у вигляді позитивного забарвлення індукованих на лужну фосфатазу зразків (рис. 1).

В подальшому (на 28—му добу культивування) при використанні спеціального методу забарвлення барвником Alizarin Red відзначали формування мінеральних комплексів, що свідчило про подальшу остеодиференціацію клітин під впливом остеогенного живильного середовища.

В досліджуваних зразках виявляли остеобласти, що формували кісткову пластинку, забарвлені у специфічний червоний колір, що є свідченням раннього етапу остеодиференціювання (рис. 2).

Пізніше остеодиференціювання клітин, що характеризувалось появою кальцифікованого матриксу та відповідними морфологічними змінами диференційованих клітин, що мали характерні вирости, підтвержене результатами забарвлення за методом фон Косса.

За даними морфометричного аналізу впливу індукційного остеогенного живильного середовища на клітини, виділені з жирової тканини, ефективність диференціювання клітин становила 68%.

При культивуванні клітин, виділених з жирової тканини, в хондрогенному живильному середовищі відзначали формування клітинних агрегатів, морфологічні зміни клітин (вони набували сферичної форми) та секрецію значної кількості позаклітинного матриксу.

Ядро зміщене до краю клітини, відзначали характерну вакуолізацію цитоплазми, появу гелеподібного позаклітинного матриксу.

Такі морфологічні зміни клітин свідчили про набуття ними характеристик клітин хрящової тканини, що підтверджене експресією цими клітинами основних маркерів хондрогенезу — колагену II типу та агрекану (рис. 3).

За даними морфометричного аналізу, ефективність хондрогенного диференціювання клітин становила 31%.

При культивуванні культури клітин в адипогенному живильному середовищі в клітинах виявляли ут-

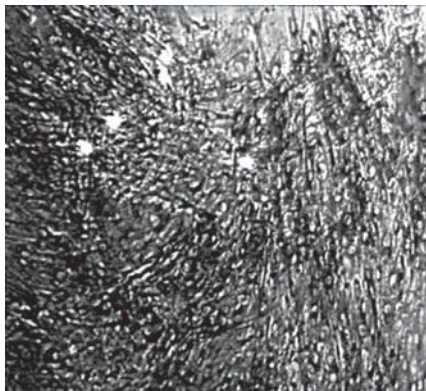


Рис. 1.
Мікрофото.
Культура клітин, виділених з жирової тканини, 7-ма доба експерименту. Забарвлення на лужну фосфатазу. 36. × 200.

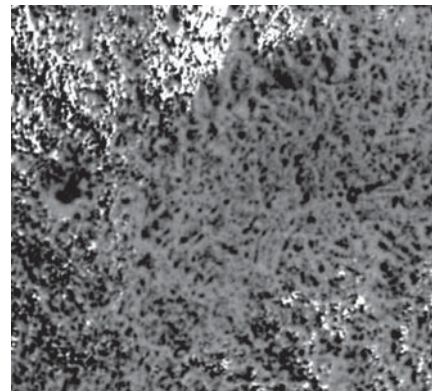


Рис. 2.
Мікрофото.
Культура клітин, виділених з жирової тканини, 28-ма доба експерименту. Забарвлення Alizarin Red. 36. × 200.

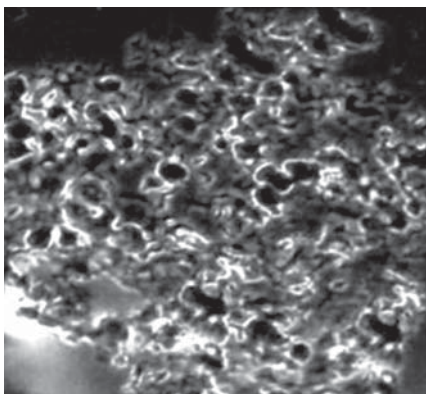


Рис. 3.
Мікрофото.
Клітини, виділені з жирової тканини, 28-ма доба експерименту. Хондрогенне диференціювання. Забарвлення на агрекан. 36. × 200.

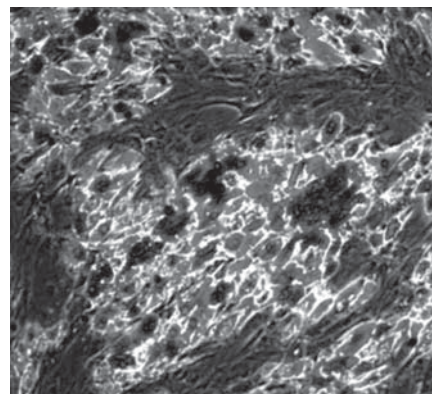


Рис. 4.
Мікрофото.
Клітини, виділені з жирової тканини, 28-ма доба експерименту. Адипогенне диференціювання. 36. × 200.

ворення ліпідних вакуолей. Вакуолі в цитоплазмі під час культивування мали тенденцію до злиття, утворення єдиного жирового включення, формуючи "кільце—печатку", що характерне для зрілих адипоцитів.

Ядро зміщувалося до периферії клітини, цитоплазма мала вигляд вузького обідка, клітина набувала шароподібної форми.

Крім того, в клітинах накопичувались нейтральні жири, утворювалися кластери адипоцитів.

Подібні морфологічні зміни клітин свідчили про набуття ними характеристик жирової тканини — адипоцитів, що підтверджене за-

барвленням Oil Red O та гематоксиліном (рис. 4).

За даними морфометричного аналізу, 75% клітин в культурі диференціювалися в адипогенному напрямку.

Результати проведеного експериментального дослідження за умов *in vitro* свідчили, що клітини, виділені з жирової тканини, за своїми морфологічними та культуральними характеристиками є ММСК.

Отримана з жирової тканини культура ММСК в подальшому може бути використана під час проведення другого етапу запланованих досліджень за умов *in vivo*.

ВИСНОВКИ

1. Клітини, виділені з жирової тканини, а саме третьої клітинної субпопуляції мають морфологію фібробластів, адгезивні властивості та здатність до колонієутворення, тобто, ознаки стовбурових клітин.

2. Здатність до спрямованого диференціювання за остеогенним, хондрогенним та адипогенним напрямками свідчить, що клітини, виділені з жирової тканини, є ММСК.

3. Результати експерименту, проведеного за умов *in vitro*, обґрунтують доцільність експериментальних досліджень за умов *in vivo*

ЛІТЕРАТУРА

1. Current perspectives in therapeutic myocardial angiogenesis / T. Kinnaird, E. Stabile, S. E. Epstein, S. Fuchs // *J. Interv. Cardiol.* — 2003. — Vol. 16, N 4. — P. 289 — 297.
2. Кирик В. М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине / В. М. Кирик, Г. М. Бугенко // *Журн. АМН України.* — 2010. — Т. 16, № 16. — С. 576 — 604.
3. Humpert P. M. Adult vascular progenitor cells and tissue regeneration in metabolic syndrome / P. M. Humpert, H. Eichler, A. Lammert // *Vasa.* — 2005. — Vol. 34, N 2. — P. 73 — 78.
4. Zuk P. A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian // *Mol. Biol. Cell.* — 2002. — N 13. — P. 4279 — 4295.
5. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives / V. Planat—Benard, J. S. Silvestre, B. Cousin [et al.] // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109. — P. 656 — 660
6. Стромальные клетки предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании / А. Ю. Петренко, Ю. А. Петренко, Н. Г. Скоробогатова [и др.] // *Журн. АМН України.* — 2008. — Т. 14, № 2. — С. 354 — 365.

