

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



УДК 616–008.847.9–092:576.31:612.397

## МОРФОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОФЕНОТИПОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛІТИН ЛІПОАСПІРАТУ

О. Ю. Усенко, Р. В. Салютін, К. М. Запольська, С. С. Паляниця, Л. А. Панченко

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

## MORPHOLOGICAL AND IMMUNOPHENOTYPE OF DESCRIPTION OF LIPOASPIRATE CELLS

O. Yu. Usenko, R. V. Salyutin, K. M. Zapolskaya, S. S. Palyanitsya, L. A. Panchenko

Coordinating Center of Organs, Tissues and Cells Transplantation,  
Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, Kyiv

Кінець XX — початок XXI століття ознаменувався бурхливим розвитком клітинної біології, особливо в напрямку дослідження СК. Це, перш за все, зумовлене унікальними характеристиками, притаманними СК, та перспективами їх використання в клінічній практиці [1, 2].

Практика клінічного застосування СК має більш ніж 40—річну історію. Класичним прикладом є трансплантація СК в комплексі лікування гемато— та онкогематологічних захворювань, де використовують СК кісткового мозку.

Проте, незважаючи на переваги, клінічне використання СК обмежене, що зумовлює необхідність пошуку альтернативних джерел СК [3, 4].

В останні роки науковці як джерело СК вивчають жирову тканину, причому, отримання їх культури з ліпоаспірату — доволі простий процес [5].

Можливість клінічного використання клітин, виділених з жирової тканини, ґрунтується на припущенні, що виділені клітини мають аналогічні СК кісткового мозку характеристики, а саме, вони мультипотентні та здатні до активного диференціювання [6].

Мета дослідження: визначити можливість та потенціал (мультипотентність) диференціювання СК, виділених з жирової тканини.

### Реферат

В експериментальному дослідженні вивчені морфологічні та імунофенотипові характеристики клітин, виділених з жирової тканини.

Встановлено, що клітини, виділені з ліпоаспірату, а саме клітини третьої субпопуляції, характеризуються ознаками, притаманними мезенхімальним стовбуровим клітинам (СК) і аналогічними таким СК кісткового мозку.

Наявність у клітин, виділених з ліпоаспірату, ознак, що характеризують їх як СК, зумовлює перспективність їх використання в клінічній практиці.

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

### Abstract

In an experimental investigation immunophenotype and morphological characteristics of cells isolated from adipose tissue were studied. It is established that cells derived from lipoaspirate, namely the third subpopulation cells, characterized by the features inherent to mesenchymal stem cells (SC) and SC similar to those of bone marrow. The presence of cells isolated from lipoaspirate, features that characterize them as the SC, is the perspective of their use in clinical practice.

**Keywords:** stem cells; adipose tissue; experiment.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для отримання культури клітин з збереженням умов асептики й антисептики після евтаназії (шляхом передозування розчину кетаміну) оперативним шляхом з пахвинних ділянок мишей ліній FVB—Cg—Tg(GFP)5Nagy/J (трансгенні за GFP) виділяли фрагменти підшкірного прошарку.

Отримані фрагменти відмивали у фосфатно—сольовому буфері (PBS) з додаванням антибіотиків PenStrep (Sigma, США), подрібнювали ножицями в 0,1% розчині колагенази 1А (РАА, США).

Отриману суміш залишали на 3 год при температурі 37 °С, постійно

перемішуючи, після чого обережно ресуспензували до утворення однорідної суспензії, додавали рівний об'єм повного живильного середовища DMEM (Sigma, США) з 10% фетальної сироватки корів (FBS) і центрифугували протягом 5 — 7 хв при 2 000 об./хв. Відбирали надосадову рідину, що містила зрілі адипоцити, осад повторно ресуспензували в живильному середовищі.

Після фільтрування через клітинний фільтр з діаметром пор 70 мкм клітини підраховували в камері Горяєва та переносили в культуральні флакони з повним живильним середовищем з розрахунку (0,12—0,15) × 10<sup>6</sup> клітин в 1 см<sup>2</sup> культуральної поверхні.

Усі зразки клітин культивували за стандартних умов в CO<sub>2</sub>—інкубаторі при температурі 37 °С та зволоженої атмосфері з концентрацією CO<sub>2</sub> 5%. Субкультивування проводили при досягненні культурою 80 — 90% конфлюентності моношару.

Кондиційоване середовище зливали, клітини промивали 1 мл розчину EDTA, додавали 0,05% розчин трипсину (Sigma, США) до руйнування моношару. Шляхом додавання рівного об'єму повного живильного середовища інгібували активність ферменту. Суспензію клітин збирали і центрифугували протягом 5 хв при 200 g, отримували культуру СК.

Морфологічну характеристику клітин здійснювали за допомогою фазово—контрастної мікроскопії на інвертованому мікроскопі Leica DMIRB. Критеріями морфологічного аналізу вважали: розміри та форму клітин, ядро—цитоплазматичне відношення, гомогенність цитоплазми, наявність ядерця у ядрі. Оцінку проводили як в нативних препаратах, так і після забарвлення культури за Гімза.

Мітотичний індекс обчислювали у фазі логарифмічного росту, тривалість цитогенерації визначали у 3 зразках через 24 год після засівання клітин на культивацийне середовище, з інтервалом 12 год, протягом 3 діб. Тест на життєздатність клітин проводили після зняття клітин з культурального флакону після ферментної обробки, забарвлення через кожні 1 — 2 год протягом доби. Каріотип клітин визначали в стадії

логарифмічного росту, коли в культурі клітин відбувалася значна кількість мітотичних циклів.

Фенотип клітин визначали за маркерами CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 з використанням моноклональних антитіл (Becton Dickinson, США). Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі—сортері BD FACS Aria (Becton Dickinson, США) за допомогою програми BD FACS Diva 6.1.

Статистична обробка отриманих результатів проведена за допомогою електронних таблиць Microsoft® Office Excel (build 11.5612.5703) та програми для статистичного обчислення Statgraphics Plus 5.1 Enterprise edition (@Statistical Graphics corp. 2001).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфологія клітин, виділених з жирової тканини, фібробластоподібна. За допомогою фазовоконтрастної мікроскопії в отриманих популяціях клітин під час культивування виділені три субпопуляції.

Перший тип представляв субпопуляцію малих веретеноподібних клітин діаметром від 10 до 15 мкм. Ядро з чіткими контурами, цитоплазма гомогенна.

Другий тип — клітини діаметром до 40 мкм, округлої форми, з витягнутим цитоплазматичним відростком, темним ядром, зміщеним на периферію, гетерогенною цитоплазмою, підвищеною гранулярністю в ділянці ядра.

Третя субпопуляція клітин, що домінувала в культурі — клітини діаметром до 80 мкм, з фібробластоподібною морфологією (рис. 1).

Цитоплазма клітин третьої групи містила значну кількість вакуолей і гранул.

У фазі логарифмічного росту клітин визначали мітотичний індекс та тривалість цитогенерації.

Співвідношення мітотичних клітин до загальної кількості клітин в культурі становило 32%.

Період подвоєння кількості клітин в культурі від 54 до 62 год, у середньому (58 ± 1,2) год.

Саме клітини третьої субпопуляції характеризувались високою адгезивністю, здатністю до колонієутворення (рис. 2).

Клітини зазначеної субпопуляції здатні проліферувати в культурі більш ніж 72 рази. Результати дослідження свідчили, що в досліджуваній культурі 87,5% клітин життєздатні та готові до мітотичного циклу.

Під час культивування клітини третьої субпопуляції характеризувались здатністю до самооновлення та збереження первинного фенотипу. На етапах культивування результати каріологічного аналізу свідчили про відсутність порушень та аномалій клітинного геному на рівні хромосом.

Вміст ДНК від пасажу до пасажу, тобто, кількість генетичного матеріалу в досліджуваних клітинах не змінювалась.

Коефіцієнт розподілу на 2—му та 13—му пассажах становив 1,36. Отримані дані характерні для культур клітин, що нормально розвиваються.

При досягненні шляхом культивування клітинами 90% моношару отримані клітини субкультивували до 2 — 3 пасажів, після чого аналізували наявність маркерів, характерних для мультипотентних мезенхімальних СК.

Аналіз проводили за методом непрямої імунофлуоресценції до різних поверхневих антигенів з використанням методики проточної цитофлуориметрії на цитометрі Cytomics® FC500 (Beckman Coulter, Німеччина).

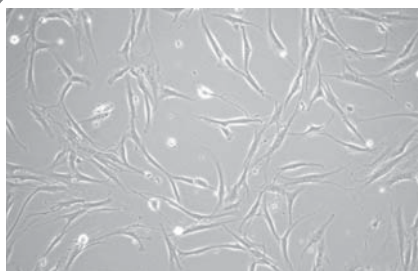


Рис. 1.  
Мікрофото.  
Фібробластоподібні клітини  
(третья субпопуляція).  
Забарвлення за Гімза. Зб. ×200.



Рис. 2.  
Мікрофото.  
Колонієутворення клітинами третьої  
субпопуляції, виділеними з жирової  
тканини.  
Забарвлення за Гімза. Зб. ×50.

Оскільки єдиного маркера для ідентифікації мультипотентних мезенхімальних СК немає, їх імунофенотип досліджували з використанням набору з кількох антигенів, загальноприйнятого для дослідження у світі.

Результати дослідження свідчили про експресію клітинами, виділеними з жирової тканини, молекул адгезії: рi—інтегрину (CD29), 1,2,4,6—інтегрину (CD49a, b, d, f), рецептору гіалуронової кислоти (CD44), ICAM—1 (CD54), трансферрецептору (CD71).

На поверхні клітин експресувалися також поверхневі ферменти CD10 (neutral endopeptidase), CD13 (aminopeptidase N), CD73 (ecto—5'—terminal nucleotidase).

Відзначено експресію білків позаклітинного матриксу: CD90 (Thy), CD105 (endoglin), CD166 (ALCAM).

Досліджувані клітини не експресували маркери CD34 (sialomucin), CD45 (LCA), CD117 (c—kit), CD133.

В популяціях клітин, отриманих з жирової тканини, відсутня експресія

Major Histocompatibility Complex (головного комплексу гістосумісності) 1 та 2 класу.

На поверхні клітин також відсутня експресія маркерів CD25 (IL—2R), CD31 (PECAM—1), CD106 (VCAM), CD120a (TNF— $\alpha$ —IR), CD124 (IL—4R), Stro—1.

На гістограмах наведено графічне відображення математичної обробки результатів експресії поверхневих маркерів мультипотентних мезенхімальних СК.

Встановлено, що морфологія та імунофенотип клітин, виділених з жирової тканини, аналогічні таким мезенхімальним мультипотентним СК, виділених з кісткового мозку.

Стромальні клітини жирової тканини в культурі *in vitro* позитивні за поверхневими маркерами CD44, CD73, CD90, Sca—1 та негативні за маркерами CD38, CD45, CD34, CD31 та CD117. Слід зауважити, що частка позитивно забарвлених клітин по досліджуваних маркерах становила для CD44 — 97,1%, CD90 — 97,2%, CD105 — 97,7%.

Водночас виявлені деякі відмінності клітин, виділених з жирової тканини, від мезенхімальних мультипотентних СК, виділених з кісткового мозку, по маркерах CD49d і CD106.

## ВІСНОВКИ

1. Клітини третьої субпопуляції, виділені з ліпоаспірату, за своїми морфологічними та імунофенотиповими характеристиками аналогічні мезенхімальним СК, виділеним з кісткового мозку.

2. Наявність у клітин, виділених з ліпоаспірату, ознак, що характеризують їх як СК, і відсутність порушень та аномалій клітинного геному на хромосомному рівні під час культивування, зумовлюють перспективність їх використання в клінічній практиці, зокрема, як альтернативу СК, виділеним з кісткового мозку.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Применение аутологичных стволовых мезенхимальных клеток в кардиологии и травматологии / В. К. Гринь, А. А. Штутин, В. Ю. Михайличенко [и др.] // Журн. НАМН України. — 2011. — Т. 17, № 1. — С. 67 — 75.
2. Петренко А. Ю. Трансплантация мезенхимальных стромальных клеток — перспективы и реальность / А. Ю. Петренко, Ю. А. Петренко // Медицина сьогодні і завтра. — 2011. — № 1—2. — С. 50 — 51.
3. Adipose tissue: stem cells and beyond / S. S. Tholpady, R. Lull, R. C. Ogle [et al.] // Clin. Plast. Surg. — 2006. — Vol. 33. — P. 55 — 62.
4. Encapsulation of adipogenic factors to promote differentiation of adipose—derived stem cells / J. P. Rubin, A. J. DeFail, N. Rajendran, K. G. Marra // J. Drug Target. — 2009. — Vol. 17, N 3. — P. 207 — 215.
5. Fat injection: from filling to regeneration; ed. by S. R. Coleman, R. F. Mazzola. — 2009. — 800 p.
6. Кирик В. М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине / В. М. Кирик, Г. М. Бутенко // Журн. НАМН України. — 2010. — Т. 16, № 16. — С. 576 — 604.

