

ДО МЕТОДИКИ ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЇ ФРАКЦІЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ КОТІВ

В. В. Ковпак, к.вет.н., ст. викладач

О. С. Ковпак, аспірант

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Жирова тканина на даний час є перспективним джерелом культури стовбурових клітин для використання у регенеративній медицині. Не зважаючи на це, методика виділення клітин з жирової тканини майже не удосконалилася з часів Родбелла, піонера у цьому напрямку. Тому основним питанням, що розглядається у статті, є порівняння різних методів виділення клітинного матеріалу з жирової тканини котів. Авторами наведено 10 варіацій обробки первинного матеріалу. Виявлено, що додавання до середовища бичачого сироваткового альбуміну позитивно впливає на швидкість утворення моношару культури. Первинна обробка жирової тканини за поєднання колагенази, гіалуронідази та бичачого сироваткового альбуміну є найбільш ефективним з досліджуваних методів. Використання даного типу обробки дозволить отримувати високий вихід клітин стромально-васкулярної фракції з жирової тканини котів.

Ключові слова: виділення клітин, культура клітин, жирова тканина, коти.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. Регенеративна медицина є перспективною областю у відновленні пошкоджених тканини шляхом стимуляції регенеративного потенціалу самого організму за допомогою клітинних технологій [1,2]. У зв'язку з прогресуючим інтересом до даної галузі виникає необхідність пошуку джерел клітинного матеріалу. Все частіше науковці звертають свою увагу на жирову тканину, яка містить мультипотентні соматичні стовбурові клітини. Доведено, що вони можуть диференціюватися у декількох напрямках: у жирову тканину, хондроцити, остеобласти, нейронні клітини, ендотеліальні клітини та кардіоміоцити. Варто зазначити, що жирова тканина може бути отримана за мінімального інвазивного втручання, що робить її перспективним джерелом стовбурових клітин дорослого організму [3]. Тому стовбурові клітини жирової тканини в даний час стають альтернативою стромальних клітин кісткового мозку для потенційного використання в регенеративній медицині.

Аналіз досліджень та публікацій. Піонером у виділенні стовбурових клітин з жирової тканини є Родбелл, який почав їх дослідження у 1960-х роках [4]. Для їх отримання він подрібнював жирову тканину шурів, інтенсивно промивав, щоб видалити сторонні гемопоетичні клітини, інкубував фрагменти тканини низ колагеназою та центрифугував, тим самим відділяючи популяцію зрілих адипоцитів від стромально-васкулярної фракції яку і продовжував культивувати [4, 5]. Варто зазначити, що на даний час способи отримання жирової тканини не значно удосконалилися з часів Родбелла [6-8]. Тому виникає необхідність пошуку нових методів отримання клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини.

Мета дослідження: порівняти різні методи отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів.

Матеріали і методи досліджень: у досліді

для отримання культур клітин використовували жирову тканину котів. Матеріал отримували, під час планової гістеректомії за згоди господарів тварин та з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року).

Жирову тканину отримували від трьох здорових безпородних кішок. Перед проведенням оперативного втручання тварин піддавали наркозу шляхом одноразового внутрішньом'язового введення препарату «Золетил 100» в дозі 15 мг на 1 кг маси тіла тварини. Для премедикації за 15 хвилин до наркозу підшкірно вводили атропін сульфат в дозі 0,04 мг/кг. Оперативне поле обробляли 5 % спиртовим розчином йоду.

Для доступу до підшкірної клітковини робили розтин 3-4 см нижче пупа по білій лінії та відпрепарували шматочки жирової тканини у кількості, що в подальшому не зашкоджувала б нормальному відновленню тварини. Далі тваринам проводили планову гістеректомію.

Отримані шматочки жирової тканини поміщали у чашки з фосфатно-буферним розчином (ФБР) (Sigma, США) та переносили у ламінарний бокс, де 3 рази промивали ФБР та подрібнювали на шматочки розміром 2-3 мм.

Для визначення оптимального методу отримання культури клітин отримані шматочки розділяли у пробірки по 10мг та додавали 1 мл середовища Ігла модифіковане Дюльбеко (DMEM) (Sigma, США) з:

1. колагеназою тип II (Sigma, США) 1 мг/мл + (бичачий сироватковий альбумін) BSA (Sigma, США);

2. колагеназою тип II 2мг/мл + BSA;

3. гіалуронідаза 5 мг/мл (LifeGlobal, Бельгія);

4. гіалуронідаза 10 мг/мл;

5. гіалуронідаза 20 мг/мл;

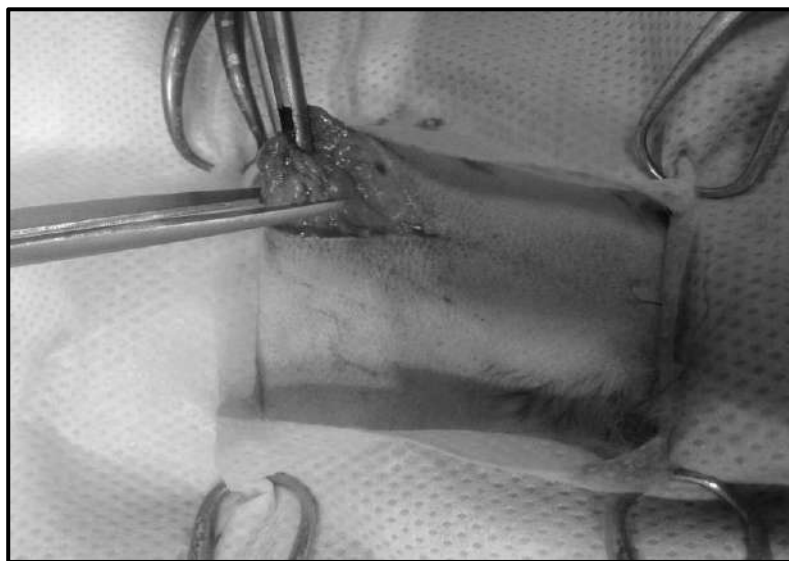
6. колагеназою тип II 1мг/мл + гіалуронідаза 5 мг/мл +BSA;

7. колагеназою тип II 1мг/мл + гіалуронідаза 5 мг/мл;

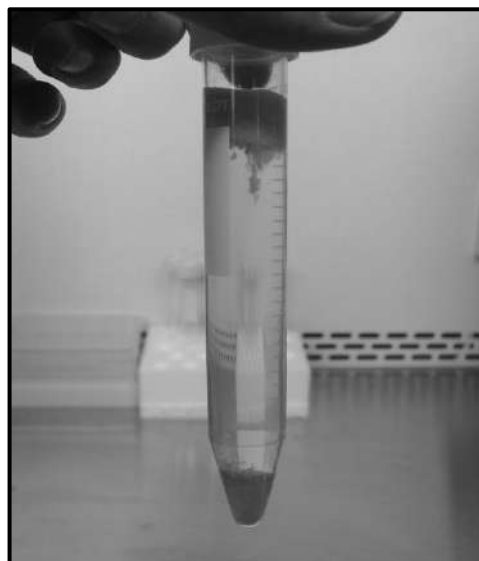
8. колагеназою тип II 1мг/мл + гіалуронідаза 10 мг/мл + BSA [9];

9. колагеназою тип II 1мг/мл + гіалуронідаза 10 мг/мл;

10. без додавання реактивів (модифікований метод експланту – шматочки тканини заливали стандартним культуральним середовищем).



а)



б)

Рис. 1. Відбір жирової тканини для досліджень:

а) резекція підшкірної клітковини; б) жирова тканина після подрібнення і центрифугування.

Пробірки поміщали у CO₂ інкубатор за 37° С та 5 % концентрації CO₂ на 1 годину. Після закінчення визначеного часу їх піддавали центрифугуванню протягом 20 хв при відцентровій силі 300 g. Далі зливали надосадову рідину, а до осаду клітин додавали стандартне поживне середовище (80 % – DMEM; 20 % – FBS; 10 мкл/см³ – антибіотика-антимікотика), розпіпетовували, переносили в чашки Петрі з культуральним середовищем та ставили на культивування у CO₂-

інкубатор.

Для визначення оптимального методу деагрегації виконували підрахунок кількості колоній на 5 день та підрахунок кількості клітин після утворення моношару у одному з варіантів досліду.

Результати власних досліджень: Для визначення оптимального методу отримання культури клітин жирової тканини котів порівнювали 10 комбінацій середовищ (табл. 1).

Таблиця 1

Порівняння різних методів отримання культури клітин з жирової тканини котів (M±m, n=3)

№ п/п	Тип обробки	К-ть колоній (5 день), шт.	Конфлюент-ність (9 день), %	К-ть клітин (9 день), тис.
1	Колагеназа тип II 1мг/мл + BSA	6,00± 0,60**	44,30±3,70*	145,30±3,70*
2	Колагеназа тип II 2мг/мл + BSA	1,30±0,40	68,30±4,80**	310,00±23,20**
3	Гіалуронідаза 5 мг/мл	0,00±0,00** (поодинокі кл.)	4,00±1,20***	9,3 0±0,80***
4	Гіалуронідаза 10 мг/мл	1,30±0,40	9,30±0,80***	20,70±2,50***
5	Гіалуронідаза 20 мг/мл;	3,30±0,40	23,30±1,90	118,30±10,60
6	Колагеназа тип II 1мг/мл + гіалуронідаза 5 мг/мл + BSA)	9,00±0,50***	81,70±4,80***	466,70±21,30***
7	Колагеназа тип II 1мг/мл + гіалуронідаза 5 мг/мл	3,70±0,40	46,70±3,90**	149,70±4,50**
8	Колагеназа тип II 1мг/мл + гіалуронідаза 10 мг/мл + BSA	16,30±0,40***	90,10±2,50***	560,00±52,30**
9	Колагеназа тип II 1мг/мл + гіалуронідаза 10 мг/мл	7,30±0,40***	55,00±2,90**	175,00±14,50*
10	Стандартне культуральне середовище (контроль)	2,30±0,40	27,30±1,50	127,30±1,50

Примітки: * P<0,001; ** P<0,01; *** P<0,05 (контролем слугував 10 метод (без додавання ферментів)).

Отримані нами дані свідчать, що найбільш оптимальним метод обробки жирової тканини котів, з досліджених, є комбінація колагенази тип II 1 мг/мл з додаванням гіалуронідази 5 мг/мл та BSA. Кількість клітин, за використання вказаного методу, на 9 добу культивування складала

560,00±52,30 тис., що у 4,4 рази вище показника у групі чашок без застосування ферментів (контроль).

Дещо нижчий показник проліферації клітин спостерігали за використання колагенази тип II 1 мг/мл з додаванням гіалуронідази 5 мг/мл та

BSA, він складав $466,70 \pm 21,30$ тис. клітин на 9 добу культивування, що у 3,7 разів вище контролю.

Третім за результативністю (кількість колоній клітин та швидкість проліферації клітин) був метод з використанням колагенази тип II 2 мг/мл з додаванням BSA. Кількість клітин за даного методу обробки жирової тканини котів була у 2,4 рази більше порівняно з контролем.

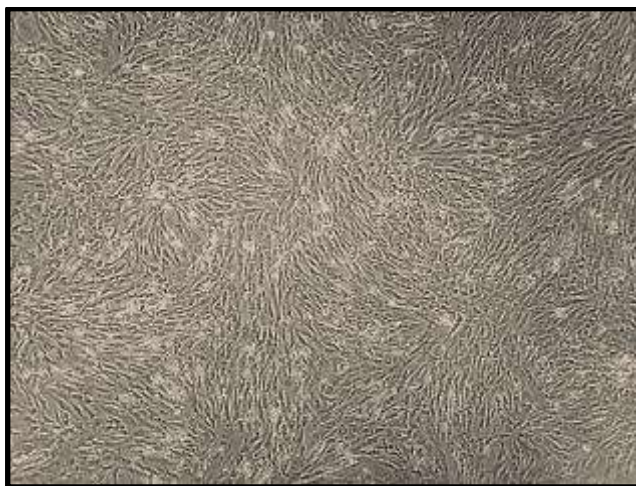
Інші досліджувані методи значно поступалися описаним у ефективності отримання культури клітин жирової тканини котів.

Як видно з результатів дослідження наведених у таблиці 1 додавання до середовища

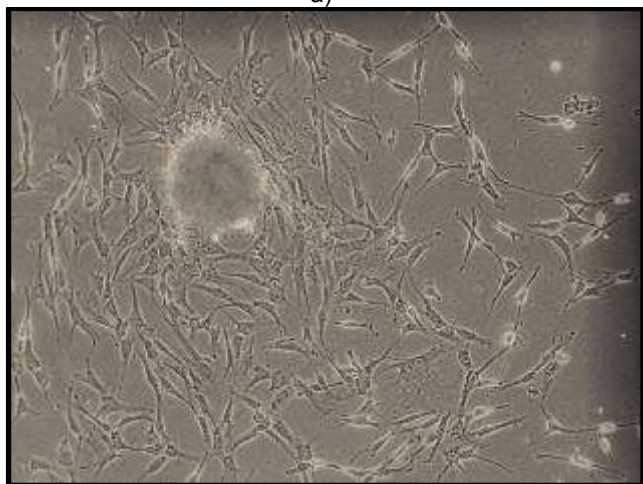
BSA значно підвищувало ефективність отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів. Отримані дані можна пояснити позитивним впливом бичачого сироваткового альбуміну на експресію цитокінів з паралельною негативною дією на ступінь прояву генів адипоцитів [10]. Додатково BSA зв'язує вільні жирні кислотищо виділяються при культивуванні [10] (у великих концентраціях, вони діють як детергенти і викликають порушення ліпідного бішару мембран [11]).



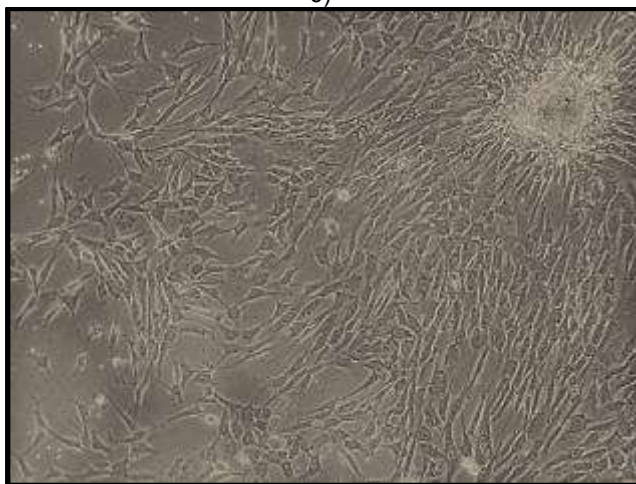
а)



б)



в)



г)

Рис. 2. Мікрофотографія культури клітин жирової тканини котів, 9 доба культивування (0 пасаж): а) метод 2 (колагеназою тип II 2мг/мл + BSA); б) метод 8 (колагеназа тип II 1мг/мл + гіалуронідаза 10 мг/мл + BSA); в) метод 5 (гіалуронідаза 20 мг/мл); г) метод 10 (експланту). Нативні препарати. Зб. а, б - ок.×10, об.×5; в, г - ок.×10, об.×10.

Отримані дані свідчать, що найкращий результат можна отримати при поєднанні двох ферментів колагенази та гіалуронідази з додаванням бичачого сироваткового альбуміну. Поясненням цього може бути комплексний вплив ферментів на жирову тканину. Так, гіалуронідази - група ферментів, що регулюють метаболізм гіалуронової кислоти, реконструюють позаклітинний матрикс [12] та зменшують в'язкість біологічних рідин, що робить тканину більш сприятливою для

інших речовин [13] (таких як колагеназа). Паралельно колагеназа розщеплює багату колагеном строму жирової тканини та звільняє інтерстеційні клітини [14]. Оптимально підібраний склад середовища для первинної обробки за рахунок комплексного впливу ферментів дозволив розщепити міжклітинні зв'язки та мінімізувати негативний вплив на клітини стромально-васкулярної фракції.

Висновки. 1. Поєднання колагенази, гіалу-
Вісник Сумського національного аграрного університету
Серія «Ветеринарна медицина», випуск 11 (41), 2017

ронідази та бичачого сироваткового альбуміну є найбільш ефективним методом дезагрегації жирової тканини котів.

2. Додавання бичачого сироваткового аль-

буміну до дезагрегуючого розчину позитивно впливає на швидкість утворення моношару культури клітин жирової тканини котів.

Список використаної літератури:

1. Xu H., Barnes G.T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C.J., Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L. A., Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003. № 112. P. 1821-1830.
2. Bunnell B. A., Flaate M., Gagliardi C., Patel B., Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008. № 45(2). P. 115-120.
3. Witkowska-Zimny M., Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell MolBiol Lett*. 2011. № 16(2). P. 236-57.
4. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J BiolChem*. 1966. № 241. P. 130-139.
5. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J BiolChem*. 1966. № 241. P. 3909-3917.
6. Chen Y. J., Liu H. Y., Chang Y. T., Cheng Y. H., Mersmann H. J., Kuo W. H., Ding S. T. Isolation and differentiation of adipose-derived stem cells from porcine subcutaneous adipose tissues. *J Vis Exp*. 2016. № 109. 53886
7. Francis M. P., Sachs P. C., Elmore L. W., Holt S. E. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction. *Organogenesis*. 2010. № 6(1): 11-14.
8. Digirolamo C. M., Stokes D., Colter D., Phinney D. G., Class R., Prockop D. J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*. 1999. № 107. P. 275-281.
9. Спосіб отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів: пат. 118933. Україна. № 201704458; заявл. 05.05.2017; опубл. 28.08.17, Бюл. № 16.
10. Carswell K. A., Lee Mi-Jeong, Fried S. K. Culture of isolated human adipocytes and isolated adipose tissue. *Methods MolBiol*. 2012. № 806. P. 203-214.
11. Henriksen J. R., Andresen T. L., Feldborg L. N., Duelund L., Ipsen J. H. Understanding detergent effects on lipid membranes: a model study of lysolipids. *Biophys J*. 2010. № 98(10). P. 2199-2205.
12. Kemparaju K., Girish K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell BiochemFunct*. 2006. № 24. P. 7-12.
13. Menzel E. J., Far C. Hyaluronidase and its substrate: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett*. 1998. № 131. P. 3-11.
14. Seaman S. A., Tannan S. T., Cao Y., Peirce S. M., Lin K. Y. Differential effects of processing time and duration of collagenase digestion on human and murine fat grafts. *Plast Reconstr Surg*. 2015. 136(2). P. 189-199.

References:

1. Xu H., Barnes G. T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C. J., Sole J., Nichols A., Ross J. S., Tartaglia L. A. and Chen H. (2003), "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance", *J Clin Invest*, No.112, pp. 1821-1830.
2. Bunnell B. A., Flaate M., Gagliardi C., Patel B. and Ripoll C. (2008), "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation", *Methods*, No. 45(2), pp. 115-120.
3. Witkowska-Zimny M. and Walenko K. (2011), "Stem cells from adipose tissue", *Cell MolBiol Lett*, No.16(2), pp. 236-57.
4. Rodbell M. (1966), "Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism", *J BiolChem*, No 241, pp.130-139.
5. Rodbell M. (1966), "The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin", *J BiolChem*, No 241, pp. 3909-3917.
6. Chen Y. J., Liu H. Y., Chang Y. T., Cheng Y. H., Mersmann H. J., Kuo W. H. and Ding S. T. (2016), "Isolation and differentiation of adipose-derived stem cells from porcine subcutaneous adipose tissues", *J Vis Exp*, No 109, pp. 53886
7. Francis M. P., Sachs P. C., Elmore L. W. and Holt S. E. (2010), "Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction", *Organogenesis*, No 6(1), pp.11-14.
8. Digirolamo C. M., Stokes D., Colter D., Phinney D. G., Class R. and Prockop D. J. (1999), "Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate", *Br J Haematol*, No 107, pp. 275-281.

9. Kovpak V. V., Kovpak O. S., Mazurkevych A. Y. and Kharkevych Yu. O. *A method of obtaining a culture of cells of the stromal-vascular fraction of adipose tissue of cats* [Sposib otrymannya kul'tury klityn stromal'no-sudynnoyi fraktsiyi zhyrovoyi tkanyny kotiv], Ukrainian patent, no.118933, 2017. (in Ukrainian)
10. Carswell K. A., Lee Mi-Jeong and Fried S. K. (2012), "Culture of isolated human adipocytes and isolated adipose tissue", *Methods Mol Biol*, No 806, pp. 203-214.
11. Henriksen J. R., Andresen T. L., Feldborg L. N., Duelund L. and Ipsen J. H. (2010), "Understanding detergent effects on lipid membranes: a model study of lysolipids", *Biophys J.*, No 98(10), pp. 2199-2205.
12. Kemparaju K. and Girish K. S. (2006), "Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target", *Cell Biochem Funct*, No 24, pp. 7-12.
13. Menzel E. J. and Far C. (1998), "Hyaluronidase and its substrate: biochemistry, biological activities and therapeutic uses", *Cancer Lett.*, No 131, pp. 3-11.
14. Seaman S. A., Tannan S. T., Cao Y., Peirce S. M. and Lin K. Y. (2015), "Differential effects of processing time and duration of collagenase digestion on human and murine fat grafts", *Plast Reconstr Surg.*, No 136(2), pp.189-199.

Ковпак В. В., Ковпак О. С. К методике получения культуры клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани кошек.

Жировая ткань в настоящее время является перспективным источником культуры стволовых клеток для использования в регенеративной медицине. Несмотря на это, методика выделения клеток из жировой ткани почти не совершенствовалась со времен Родбелла, пионера в этом направлении. Поэтому основным вопросом, который рассматривается в статье, является сравнение различных методов выделения клеточного материала из жировой ткани кошек. Авторами приведены 10 вариаций обработки первичного материала. Выявлено, что добавление к среде бычьего сывороточного альбумина положительно влияет на скорость образования монослоя культуры. Первичная обработка жировой ткани при совмещении коллагеназы, гиалуронидазы и бычьего сывороточного альбумина является наиболее эффективным с исследуемых методов. Использование данного типа обработки позволит получать высокий выход клеток стромально-васкулярной фракции из жировой ткани кошек.

Ключевые слова: выделение клеток, культура клеток, жировая ткань, коты.

Kovpak V. V., Kovpak O. S. To the method of obtain the culture stromal-vascular fraction of adipose tissue of cats.

The pioneer in obtaining stem cells from adipose tissue was Rodbell, who began their studies in the 1960s. He shredded rat fat pads, washed extensively to remove contaminating hematopoietic cells and incubated the tissue fragments with collagenase after that centrifuged, thereby separating the floating population of mature adipocytes from the pelleted stromal vascular fraction. It should be noted that at present, methods of obtaining adipose tissue have not significantly improved since the time of Rodbell. There fore, there is a need to find new methods for obtaining a cells stromal-vascular fraction of adipose tissue.

We were used adipose tissue of cats in the experiments to obtain cell cultures. Material was received during planned hysterectomies with the consent of the owners of animals and in compliance with the requirements of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruel Treatment" (Article 230 of 2006). To determine the optimal method for obtaining a cells culture of adipose tissue of cats, were compared 10 combinations of media. During the research we discovered as additions of bovine serum albumin to the medium have positively affect the rate of the cell culture monolayer formation. Primary treatment adipose tissue which combining collagenase, hyaluronidase and bovine serum albumin was most effective among the investigated methods. The using of this type of enzymatic treatment will get the significant number of cells stromal-vascular fraction from the adipose tissue of cats

Keywords: cell selection, cell culture, adipose tissue, cats.

Дата надходження до редакції: 30.10.2017 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Камбур М. Д.