

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЯДЕР И ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МСК-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

© А. В. Лавров,<sup>1</sup> С. А. Смирнихина

Медико-генетический научный центр РАМН, Москва;

<sup>1</sup> электронный адрес: avlavrov@yandex.ru

Жировая ткань (ЖТ) является легкодоступным и богатым источником клеток, подобных мезенхимным стволовым клеткам (МСК). Сведения о морфологии стволовых клеток, выделенных из ЖТ, противоречивы. В настоящей работе описана морфология и дана оценка пролиферативного потенциала клеток, выделенных из ЖТ. Исследовали МСК из ЖТ через 1 мес культивирования при плотности 10 кл./см<sup>2</sup>. Во флаконе образовалась 21 колония. В 9 из 17 проанализированных колоний обнаружили несколько нехарактерных для данной колонии клеток. Они отличались большим размером ядра и цитоплазмы. Дисперсионный анализ показал, что колонии отличаются друг от друга еще и по среднему размеру ядер клеток и разбросу размеров ядер ( $P = 0.0025$ ). Размер ядер и десятичный логарифм плотности коррелировали сильно и обратно пропорционально ( $-0.7$ ,  $P = 0.002$ ). Таким образом, культура клеток, полученных из стромально-васкулярной фракции (СВФ) ЖТ, гетерогенна и содержит клетки двух типов — мелкие быстро делящиеся и крупные медленно делящиеся, что соответствует описанию клеток в культурах МСК и ЖСК. В отдельных колониях наблюдается клеточная гетерогенность, которая может быть связана с наблюдением клеток в разных фазах клеточного цикла.

Ключевые слова: гетерогенность культуры МСК, жировая стволовая клетка, мезенхимная стволовая клетка, морфология МСК.

Принятые сокращения: ЖСК — стволовая стромальная клетка из жировой ткани, ЖТ — жировая ткань, ККМ — красный костный мозг, МСК — мезенхимная стволовая клетка, ПСК — плюрипотентная стромальная клетка, СВФ — стромально-васкулярная фракция.

В XXI в. одним из наиболее перспективных направлений медицины считают клеточную терапию с использованием мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека (МСК). Считается, что МСК можно выделить из любой ткани, но для клинических целей до недавнего времени чаще использовали красный костный мозг (ККМ), реже — пуповинную кровь. В 2001 г. было предложено (Zuk et al., 2001) использовать МСК-подобные клетки, выделенные из липоасpirата, которые практически ничем не отличаются от МСК из ККМ. Отмеченные различия касаются лишь двух поверхностных антигенов, разных условий дифференцировки и незначительно экспрессионного профиля. Клетки такого типа назвали плюрипотентными стромальными клетками (ПСК), полученными из жировой ткани (ЖТ), или стволовыми (стромальными) клетками из жировой ткани (ЖСК) (Zuk et al., 2001). ЖСК являются частью стромально-васкулярной фракции (СВФ), которая представляет собой достаточно гетерогенную смесь клеток (Astori et al., 2007). Классические маркеры стромальных клеток присутствуют примерно у половины клеток СВФ в начале культивирования и почти у 98 % клеток на более поздних пассажах (Mitchell et al., 2006).

Отмечено, что ЖТ очень гетерогенна по клеточному составу и морфологии не только у индивидов, но и полу-

ченная из разных источников от одного человека. Более того, в популяции ЖСК исследователи описывают клетки нескольких типов. Мусина с сотрудниками (2005) показали, что популяция МСК-подобных клеток из ЖТ в процессе культивирования становится гетерогенной. Клетки, полученные от одного донора, различаются по размерам (с диаметром от 10 до 300 мкм) и морфологии — обнаруживаются тонкие веретеновидные, типичные фибробластоподобные и плащевидные клетки. Кроме того, преобладает доля мелких клеток в популяции МСК-подобных клеток из ЖТ (Мусина и др., 2005). По другим данным, в популяции МСК-подобных клеток из ЖТ преобладают относительно крупные (60 мкм) клетки с фибробластоподобной морфологией, в цитоплазме которых много вакуолей и гранул. Замечена также фракция темных округлых небольших (20 мкм) клеток. Третьей разновидностью клеток были мелкие (10—15 мкм), узкие, веретенообразные клетки с гомогенной цитоплазмой (Тепляшин и др., 2005).

Таким образом, сведения о морфологии стволовых клеток, выделенных из ЖТ, противоречивы. Возможно, это связано с условиями и методиками культивирования, а также с донорами ЖТ. На наш взгляд, недостаток упомянутых работ состоит в том, что используются субъективные плохо формализуемые и практически не поддаю-

щиеся математической обработке характеристики клеток — их размеры и форма.

В настоящей работе для объективной оценки клеток были измерены размер ядра и плотность клеток в колонии. Описывается культура клеток, выделенных из ЖТ, их морфология и пролиферативный потенциал.

### Материал и методика

Клетки СВФ получали из подкожной жировой клетчатки, полученной в ходе плановой хирургической операции. Фрагмент ЖТ 1.5 см<sup>3</sup> промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), измельчали ножницами, добавляли коллагеназу I (0.3 ед./мл), инкубировали при 37 °С, периодически помешивая, в течение 40 мин. Добавляли среду, содержащую 10 % сыворотки и центрифугировали 10 мин при 600 g. Супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в ростовой среде (DMEM/F12, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, инсулин-трансферрин-селенит, 8 ед./мл гепарина, 2 мМ L-глутамин, 10 нг/мл рекомбинантного фактора роста фибробластов человека (основного, FGF-b), смесь пенициллина и стрептомицина) и помещали во флакон 75 см<sup>2</sup>. На следующий день среду меняли, удаляя все неприкрепившиеся клетки. Далее среду меняли через 3—4 сут в течение 14 сут.

Таким образом получили  $0.5 \cdot 10^6$  клеток и затем провели первый пассаж. Еще через 14 сут клетки, достигшие ~70 % конfluence, рассеяли в плотности 10 кл./см<sup>2</sup> во флакон 75 см<sup>2</sup>. Через 1 мес культивирования клетки промывали 3 раза раствором PBS и окрашивали красителем Гимза.

Число колоний во флаконе считали в проходящем свете (колонии были видны как сиреневые пятна). Анализ клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX41, оборудованного CCD-камерой. Размеры ядер определяли с помощью программы ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Фиксировали максимальную длину ядра, перпендикулярно ей определяли ширину ядра. Сумму длины и ширины принимали за размер ядра.

Использованные реактивы: DMEM/F12, инсулин-трансферрин-селенит, гепарин, L-глутамин, пенициллин и стрептомицин, PBS, краситель Гимза и коллагеназа I (Панэко, Россия); телячья эмбриональная сыворотка (PAA Laboratories, Австрия); фактор роста человека FGF-b (Проспек, Израиль).

### Результаты и обсуждение

Через 2 нед культивирования клеток, посеянных при плотности 10 кл./см<sup>2</sup> можно было обнаружить колонии, некоторые из которых выходили за пределы поля зрения (15×). Большинство клеток имело веретенообразную форму, светлую цитоплазму и ядра с 1—2 ядрышками. Плотность в колониях была равномерно низкой. Еще через 1 нед в некоторых колониях клетки достигали конfluence в центре колонии. Через 1 мес с момента посадки большинство колоний достигло конfluence в центре, и тогда клетки анализировали.

Во флаконе 75 см<sup>2</sup> при плотности посадки 10 кл./см<sup>2</sup> обнаружили 21 колонию. Большинство клеток были сильно распластаны, имели сложные, аморфные контуры и несколько широких коротких отростков, соединяющихся с

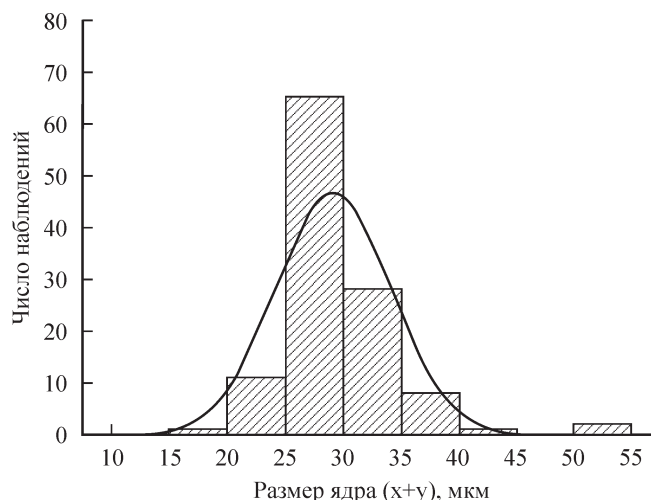


Рис. 1. Диаграмма распределения размера ядер клеток в колонии.

За размер ядра принимали сумму длины и ширины ( $x + y$ ). Кривая показывает нормальное распределение. Полученное распределение отличается от нормального (критерий Шапиро—Уилка  $W = 0.84443$ ,  $P = 0.00000$ ), что вызвано наличием выбросов — резких отклонений размера ядра.

соседними клетками. Границы колоний не пересекались. В 17 колониях считали число клеток и размеры их ядер на площади от 0.32 до 0.66 мм<sup>2</sup>.

В большинстве колоний можно было отметить несколько нехарактерных для данной колонии клеток. Они отличались большим размером ядра и цитоплазмы. Статистический анализ показал в этих колониях отклонение распределения размеров ядер от нормального. При этом

Характеристики колоний при плотности посадки 10 кл./см<sup>2</sup>

Номер колонии	Число проанализированных клеток	Число клеток после удаления выбросов	Выбросы %	Плотность в центре колоний, <sup>a</sup> кл./мм <sup>2</sup>	Средний размер ядра, мкм	SD, <sup>b</sup> мкм
1	26	23	12	$7.2 \cdot 10^3$	32.7	4.3
2	78	77	1	$19.5 \cdot 10^3$	35.1	7.8
3	18	17	6	$2.7 \cdot 10^3$	42.1	13.2
4	55	53	4	$17.2 \cdot 10^3$	36.5	5.7
5	23	23	0	$3.5 \cdot 10^3$	37.6	6.7
6	26	23	12	$5.4 \cdot 10^3$	37.7	6.2
7	8	8	0	$1.2 \cdot 10^3$	45.8	9.4
8	23	23	0	$3.5 \cdot 10^3$	44.8	11.0
9	22	20	9	$3.3 \cdot 10^3$	38.0	5.1
10	39	38	3	$12.1 \cdot 10^3$	36.2	5.3
11	24	24	0	$7.5 \cdot 10^3$	32.3	4.5
12	18	18	0	$6.3 \cdot 10^3$	31.3	6.5
13	116	114	2	$27.4 \cdot 10^3$	28.7	3.9
14	16	16	0	$5.0 \cdot 10^3$	48.5	15.2
15	37	36	3	$11.6 \cdot 10^3$	33.2	6.6
16	8	8	0	$1.2 \cdot 10^3$	70.5	6.6
17	29	29	0	$9.1 \cdot 10^3$	43.4	8.4

<sup>a</sup> Плотность рассчитана по общему числу проанализированных клеток, включая выбросы. <sup>b</sup> SD — стандартное отклонение.

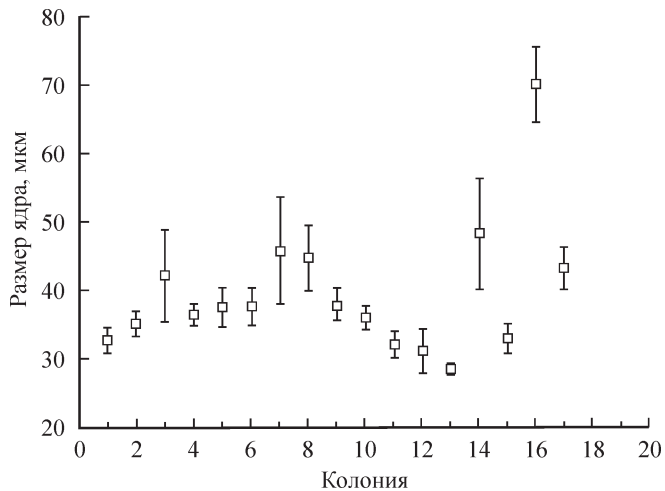


Рис. 2. Размеры ядер в колониях клеток после посадки в плотности 10 кл./см<sup>2</sup>.

Указаны средние значения и доверительный интервал среднего.

четко видно, что отклонение обусловлено выбросами в области больших значений (рис. 1). Под выбросом понимают отклонения значения изучаемого параметра более чем в 2 стандартных отклонениях от среднего. Такие значения считаются случайными, ошибочными и могут существенно исказить истинное распределение даже в больших выборках. Поэтому их исключают из дальнейшего анализа. В данном случае выбросы превысили 5—8 стандартных отклонений и также были исключены из дальнейшего анализа.

Тем не менее нужно отметить, что выбросы наблюдались в 9 из 17 колоний. Они могут быть обусловлены истинной гетерогенностью клеток в пределах одной колонии, что может происходить из-за дифференцировки части клеток во время роста колонии или из-за сохранения связей разных клеток при пассировании и дальнейшем формировании колоний из двух типов клеток. Однако наиболее вероятным объяснением небольшого (в среднем 3 %) числа крупноядерных клеток, по нашему мнению, является их регистрация в фазе G<sub>2</sub> клеточного цикла, ког-

да происходит удвоение генома и клетка готова к делению.

После исключения выбросов оказалось, что экспериментальные данные соответствуют нормальному распределению и поэтому к ним применимы методы параметрической статистики. В таблице приведены характеристики проанализированных колоний. Дисперсионный анализ показывает, что колонии отличаются друг от друга ( $P = 0.0025$ ), и на диаграмме, отражающей средние и доверительные интервалы, видно, что колонии различаются как по среднему размеру ядер клеток, так и по стандартному отклонению (рис. 2). Таким образом, культура клеток СВФ жировой ткани при пассировании с низкой плотностью (10 кл./см<sup>2</sup>) приводит к появлению колоний клеток, существенно различающихся морфологически, так как размер ядер во всех случаях соответствует размеру клетки (чем больше ядро, тем больше сама клетка). Ранее было отмечено, что в культуре МСК костного мозга можно выделить клетки двух типов, а в ранних колониях — мелкие круглые клетки третьего типа (Colter et al., 2001). В литературе можно встретить описание клеток нескольких типов в пределах популяции ЖСК: веретеновидные (мелкие), типичные фибробластоподобные (средние) и плащевидные (крупные) клетки (Мусина и др., 2005; Тепляшин и др., 2005). На рис. 2 можно отметить, что в нашем случае также наблюдаются как минимум два типа колоний: 1) колонии клеток с однородными мелкими ядрами (рис. 3, а); 2) колонии клеток с крупными ядрами с большим разбросом размеров отдельных ядер (рис. 3, б).

По нашим данным, размеры ядер клеток коррелируют с плотностью колонии и соответственно ее пролиферативным потенциалом. Из данных рис. 4, а следует, что корреляция не является линейной. Действительно, зависимость приближается к логарифмической, а размер ядер и десятичный логарифм плотности сильно и обратно пропорционально коррелируют ( $-0.7$ ;  $P = 0.002$ ) (рис. 4, б). Полученные результаты хорошо согласуются с экспоненциальной природой роста культуры клеток, а также с ранее опубликованными данными о существовании в культурах МСК субпопуляций мелких быстро делящихся клеток (Colter et al., 2001).

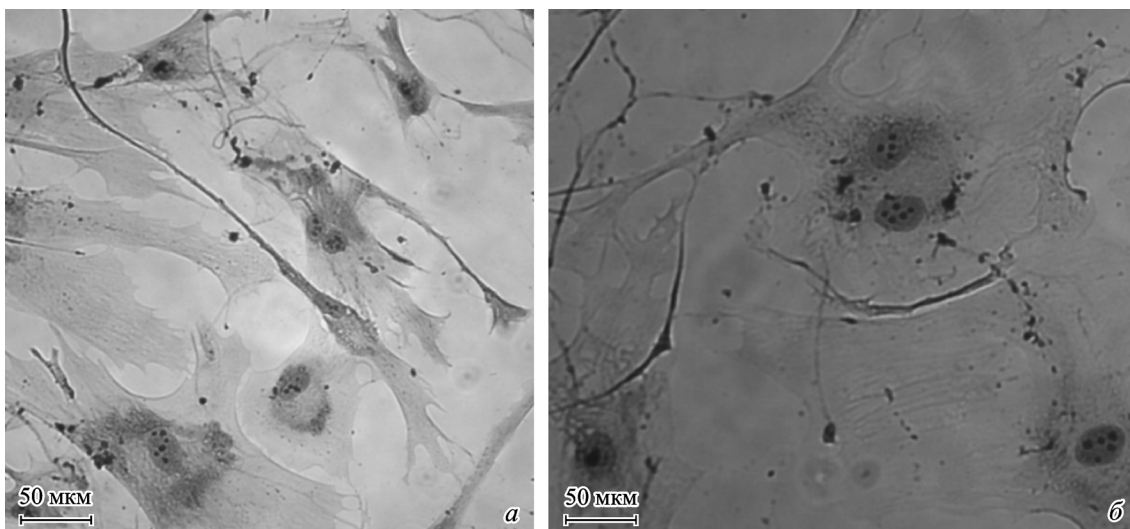


Рис. 3. Клетки в колониях двух разных типов — с маленькими (а) и с большими (б) ядрами.

а — колония 9, б — колония 16 (см. таблицу).

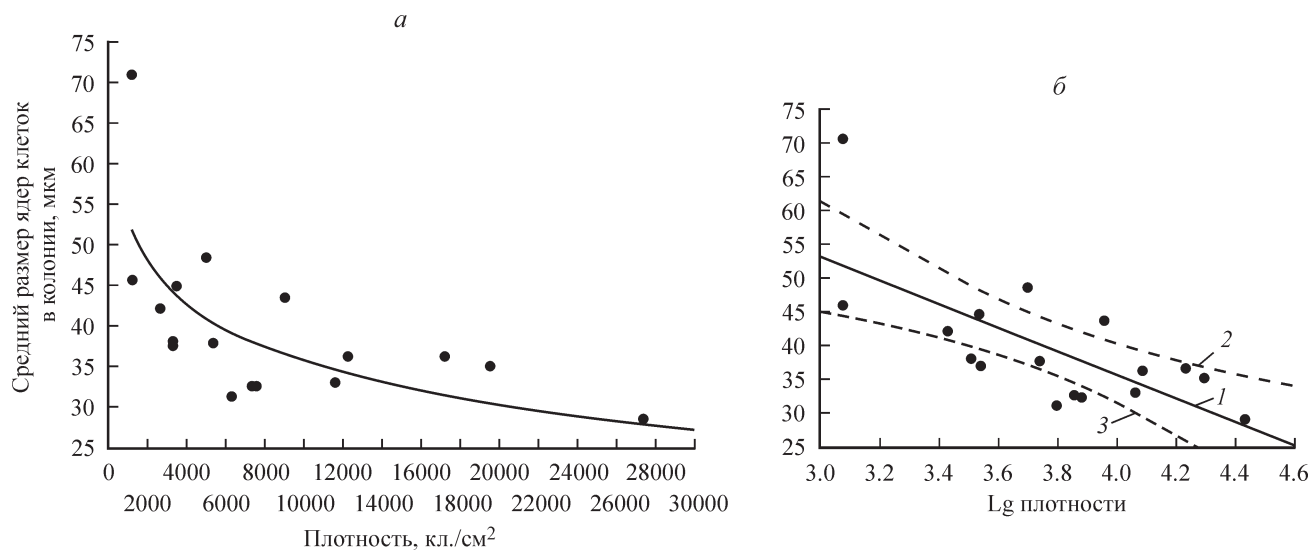


Рис. 4. Корреляция среднего размера ядер клеток и плотности клеток в колонии.

а — размеры ядер и плотность клеток в колонии коррелируют ( $r = -0.536$ ;  $P = 0.027$ ) и кривая приближается к логарифмической; б — корреляция логарифма плотности и среднего размера ядер клеток в колонии:  $r = -0.7022$ ;  $P = 0.002$ . 1 — регрессионная прямая; 2, 3 — границы 95%-ного доверительного интервала регрессионной прямой.

Таким образом, мы показали, что культура клеток, полученных из СВФ висцеральной ЖТ, гетерогенна и содержит клетки как минимум двух типов — с мелкими ядрами быстро делящиеся и с крупными ядрами медленно делящиеся. Оба типа соответствуют по морфологии ранее описанным аналогичным клеткам, обнаруженным в культурах МСК и ЖСК. В отдельных колониях также наблюдается гетерогенность размеров ядер и клеток, которая может быть связана с наблюдением клеток в разных фазах клеточного цикла. При исследовании фундаментальных аспектов жизнедеятельности стволовых клеток следует уделять особое внимание четкому определению клеточных подтипов, используемых в эксперименте. Кроме того, детальное изучение обнаруженных подтипов позволит готовить более эффективные клеточные трансплантаты для клеточной терапии.

Работа проведена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-12157) и Роснауки (МК-112.2008.7).

#### Список литературы

Мусина Р. А., Бекчанова Е. С., Сухих Г. Т. 2005. Сравнительная характеристика мезенхимных стволовых клеток, полученная из разных тканей человека. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2 : 89—94.

Тепляшин А. С., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Чупикова Н. И., Ростовская М. С., Савченкова И. П. 2005. Характеристика мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани. Цитология. 47 (2) : 130—135.

Astori G., Vignati F., Bardelli S., Tubio M., Gola M., Albertini V., Bambi F., Scali G., Castelli D., Rasini V., Soldati G., Moccetti T. 2007. «In vitro» and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. J. Transl. Med. 5 : 55 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2198906/pdf/1479-5876-5-55.pdf>).

Colter D. C., Sekiya I., Prockop D. J. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98 : 7841—7845.

Mitchell J. B., McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., Floyd Z. E., Kloster A., Di Halvorsen Y., Storms R. W., Goh B., Kilroy G., Wu X., Gimble J. M. 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. Stem Cells. 24 : 376—385.

Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tiss. Eng. 7 : 211—228.

Поступила 14 IX 2009

NUCLEAR HETEROGENEITY AND PROLIFERATIVE CAPACITY OF HUMAN  
ADIPOSE DERIVED MSC-LIKE CELLS*A. V. Lavrov, S. A. Smirnikhina*Research Center for Medical Genetics RAMS, Moscow;  
e-mail: avlavrov@yandex.ru

Adipose derived stem cells (ADSCs) are MSC-like cells which could be easily used for regenerative medicine. Here, the morphology and proliferative capacity of human ADSCs is described. ADSCs were analyzed after one month of cultivation at a density of 10 cells/cm<sup>2</sup>. 21 colonies were counted. Few atypical cells (huge nuclei and cytoplasm) were found in 9 out of 17 colonies analyzed. ANOVA demonstrated that colonies also differed ( $P=0.0025$ ) in nuclei dimensions and scatter in the dimensions in each colony. Nuclei dimensions and cell density logarithms correlated in reverse proportion ( $-0.7$ ;  $P = 0.002$ ). Thus, ADSCs were heterogeneous and represented two types of cells: small highly proliferative and large low proliferative cells. Cell heterogeneity observed in some colonies might be due to cells registered at different cell cycle phases. Stable and typical morphology, colony-formation capability and high proliferative capacity of cells indicate visceral adipose tissue as a rich source of ADSCs.

Key words: adipose derived stem cell, heterogeneity of mesenchymal stem cell morphology.

---