

**ПОДКОЖНО-ЖИРОВАЯ ТКАНЬ ЧЕЛОВЕКА,
ПОДВЕРГНУТАЯ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ ШОКУ,
КАК ИСТОЧНИК ЖИЗНЕСПОСОБНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ
С ХАРАКТЕРИСТИКАМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

© *И. П. Савченкова*¹, *С. В. Коржикова*²

¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко РАСХН
и ² ООО «Институт стволовой клетки», Москва;

¹ электронный адрес: *s-ip@mail.ru*

Из подкожно-жировой ткани (ПЖТ) человека, подвергнутой глубокому замораживанию (–70 °С) без криопротектора, выделена клеточная популяция с характеристиками мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК). Клетки в критических для ткани условиях сохраняли жизнеспособность *in vitro* и прикреплялись к пластику. Клеточная популяция отличалась гомогенностью и была представлена мелкими (диаметр 7 мкм) клетками с фибробластоподобной морфологией. Цитофлуориметрический анализ выявил на их поверхности наличие антигенов (АГ), экспрессия которых характерна для ММСК человека: CD29, CD44, CD49a, b, d, CD73, CD90, CD105, CD166 и HLA ABC. В то же время на клетках не были выявлены АГ CD34 и CD45 — маркеры клеток крови, CD31 — маркер эндотелиальных клеток, Stro-1 — маркер ММСК, а также АГ главного комплекса гистосовместимости II класса — HLA DR, HLA DP и HLA DQ. Доля клеток, несущих рецептор фактора стволовых клеток *c-kit* (CD117), составляла в среднем 3 %. При индукции к дифференцировке *in vitro* они оказались способными образовывать клетки, подобные клеткам костной, жировой и хрящевой тканей. Кариологический анализ (метод GTG-окрашивания) продемонстрировал диплоидный набор хромосом клеток без анеуплоидии и структурных перестроек. Таким образом, было установлено, что в ПЖТ, подвергнутой низкотемпературному шоку, сохраняется жизнеспособная популяция клеток с фенотипом, подобным ММСК.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, подкожно-жировая ткань, низкотемпературный шок, жизнеспособность, клеточная популяция, гомогенность, экспрессия генов, дифференцировка.

Принятые сокращения: АГ — антиген, АТ — антитело, КМ — костный мозг, ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ПЖТ — подкожно-жировая ткань, СК — стволовые клетки, СКПК — сыворотка крови плодов коров, ФЭ — фикоэритрин.

Прошло несколько десятков лет с момента открытия российскими учеными (Friedenshtein, Kuralesova, 1971; Friedenshtein et al., 1987) в костном мозге (КМ) взрослого организма популяции клеток, образующих единичные колонии фибробластов *in vitro* и способных формировать костную, хрящевую, фиброзную и жировую ткани. В настоящий момент, несмотря на огромный поток исследований, проводимых в данном направлении, остается много неясного и противоречивого (Horwitz et al., 2005; Phinney, Prockop, 2007; Bianco et al., 2008). За последние 8 лет из КМ человека были получены 4 разные субпопуляции: RS — быстро самообновляющиеся клетки (Colter et al., 2000), MARC — мультипотентные прогениторные клетки взрослого организма (Reyes et al., 2001), MIAMI — индуцированные мультилинейные клетки, выделенные из КМ (D'Ippolito et al., 2004), VSEL — очень маленькие клетки, подобные эмбриональным стволовым (Kucia et al., 2006). Клетки с подобным фенотипом, выделенные из других

источников, в частности из жировой ткани, также между собой имеют различия (Gronthos et al., 2001; Zuk et al., 2002; Тепляшин и др., 2005б). Во всех перечисленных работах получены клеточные популяции, имеющие разные свойства и признаки в зависимости от условий выделения и их культивирования. Отсутствие уникальных маркеров, позволяющих точно идентифицировать фенотип мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), и стандартных методов их выделения приводит к получению гетерогенной популяции адгезивных к пластику одноклеточных клеток, выделенных из КМ и подкожно-жировой ткани (ПЖТ), что свидетельствует о недостаточной изученности биологической основы и молекулярной природы стволовых клеток (СК) взрослого организма.

Считается, что СК обладают повышенной жизнеспособностью и устойчивостью к экстремальным условиям окружающей среды. Так, известно, что популяция стволовых мужских половых клеток (сперматогонии типа A₀)

более устойчива к химическим агентам и облучению, чем ее коммитированные потомки (сперматогонии типа A₁-A₄) (Huckins, Oakberg, 1978). Ваканты с соавторами (Vacanti et al., 2001) сообщили о наличии маленьких (диаметр 3 мкм), спорообразных клеток во всех тканях и органах млекопитающих, которые обладали высокой жизнеспособностью и сохранялись в экстремальных условиях, таких как низкотемпературный (-86 °C) и высокотемпературный (86 °C) шоки, гипоксия (кислородное голодание в течение 5 сут). Наличие в ткани, подвергшейся физиологическому шоку, клеточной популяции с характеристиками мультипотентных клеток представляет интерес.

В связи с этим целью наших исследований было изучить ПЖТ человека, подвергнутую глубокому замораживанию без криозащитного вещества, на предмет наличия в ней жизнеспособной клеточной популяции.

Материал и методика

ПЖТ получали из области пупка (липоаспирация) у пяти пациентов под местной анестезией с их согласия. Для создания экстремальной ситуации, ведущей к массовой гибели клеток, использовали низкотемпературный шок. Для этого свежезолированную ПЖТ тщательно промывали PBS, переносили в пробирки 50 мл (Coster, США) и помещали в низкотемпературный холодильник на -70 °C. Образцы ткани размораживали через 48 ч и 30 сут хранения соответственно и выделяли из них клетки по методике, описанной ранее (Zuk et al., 2002). Клетки культивировали в среде ДМЕМ с низким (1 г/л) содержанием глюкозы (Gibco InvitroGene, Life Technologies, США), с 10 % сыворотки крови плодов коров (СКПК) (HyClone, Perbio, Бельгия), с однократным раствором заменимых аминокислот и антибиотиками (Gibco, InvitroGene, Life Technologies, США). Конечная концентрация стрептомицина в среде составляла 100 мкг/мл, а пеницилина — 100 ед./мл. Морфологическую характеристику клеток проводили визуально: в нативных препаратах и в препаратах, окрашенных по Романовскому—Гимза. Жизнеспособность клеток оценивали по окраске трипановым синим (0.1%-ный раствор) и по числу клеток, прикрепленных ко дну культурального флакона и способных к размножению.

Экспрессию поверхностных антигенов (АГ) анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Epics Elite Coulter. Для этого клетки снимали с субстрата 0.25%-ным раствором трипсина, подсчитывали, отмывали и аликвоты в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток инкубировали со специфическими антителами (АТ) в разведении 1 : 30 (PBS, дополненный 2 % СКПК) при 4 °C в течение 45 мин в темноте. В наших экспериментах мышиные АТ были против АГ человека: CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49a, b, d, CD73, CD90, CD105, CD166, CD117, Stro-1, HLA ABC, HLA DR, DP, DQ (Becton Dickinson, США). В качестве вторых АТ использовали антимышьиные IgG, меченные фикоэритрином (ФЭ) в разведении 1 : 30 (Becton Dickinson, США).

Для изучения способности выделенной клеточной популяции к направленной дифференцировке *in vitro* использовали клетки на 2—3-м пассажах культивирования. Дифференцировку клеток в клетки костной ткани проводили, как описано ранее (Савченкова и др., 2008). Индукционной средой была среда ДМЕМ с 10 % СКПК, дексаметазоном (10^{-7} М), β-глицерофосфатом (10 мМ) и аскор-

биновой кислотой (0.2 мМ). Индукционную среду меняли каждые 4 сут в течение 21—28 сут. Спустя 28 сут после начала индукции клетки фиксировали ледяным метанолом в течение 5—6 мин и окрашивали по von Kossa или ализариновым красным.

Дифференцировку клеток в клетки жировой ткани проводили, как описано ранее (Тепляшин и др., 2005б). Адипогенной средой была ДМЕМ с 10 % СКПК, дексаметазоном (10^{-7} М) и инсулином (10^{-9} М). Через 3 нед клетки фиксировали и окрашивали Oil Red O в течение 10—15 мин. Затем клетки промывали и докрашивали гематоксилином в течение 1 мин.

Дифференцировку в направлении хондрогенеза осуществляли по методике, описанной нами ранее (Терлуашин et al., 2007). Для этого клетки в концентрации $5 \cdot 10^6$ агрегировали высокоскоростным центрифугированием (300 g, 5 мин) в конической центрифужной пробирке. Далее к осажденным клеткам добавляли хондрогенную среду: ДМЕМ с высоким (4.5 г/л) содержанием глюкозы, дополненную трансформирующим фактором роста TGF-β1 (BD, Германия) в конечной концентрации 10 нг/мл, дексаметазоном — 100 нМ (KRKA, Словения), аскорбат 2-фосфатом — 50 мкг/мл (Sigma, США), ITS (Gibco, США) — конечная концентрация инсулина 6.25 мкг/мл, трансферрина — 6.25 мкг/мл, селеновой кислоты — 6.25 мкг/мл, линолевой кислотой — 5.33 мкг/мл (Sigma, США) и сывороточным альбумином человека — 1.25 мг/мл (Биомед, Россия). В качестве отрицательного контроля такое же количество клеток инкубировали в питательной среде без индукторов. Через 4 нед кусочки полученных трехмерных структур фиксировали в течение 6 ч в 10%-ном нейтральном формалине и заключали в парафин по стандартной методике (Пирс, 1962). Срезы полученных образцов толщиной 5—6 мкм депарафинировали и окрашивали гематоксилин-эозином.

Для кариологического анализа клетки на стадии логарифмического роста (2-й пассаж) обрабатывали раствором колхицина (конечная концентрация 0.6 мкг/мл) и инкубировали в течение 2 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Митотически делящиеся клетки снимали с субстрата 0.25%-ным раствором трипсина в течение 5 мин при комнатной температуре. После обработки гипотоническим раствором (0.56 % KCl) в течение 10—15 мин при 37 °C клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 100 г и фиксировали смесью метанол : ледяная уксусная кислота в объемном соотношении 3 : 1. Полученную суспензию использовали для приготовления хромосомных препаратов. Хромосомные препараты анализировали методом GTG-окрашивания (предобработка 0.25%-ным раствором трипсина с последующим окрашиванием красителем Гимза на фосфатном буфере, рН 6.8).

Результаты и обсуждение

Нами были созданы критические условия, в которых погибает любая соматическая клетка, — стрессовое низкотемпературное (-70 °C) охлаждение ткани. Известно, что клетки, культивируемые *in vitro* или находящиеся в ткани, замороженные в среде без криопротектора, при оттаивании подвергаются лизису. Ответ клеток на холодовой стресс был подробно описан ранее (Fujita, 1999). Низкотемпературный шок способствует разрыву элементов цитоскелета клеток, мембран и клеточных органелл вследствие образования внутри цитоплазмы кристаллов

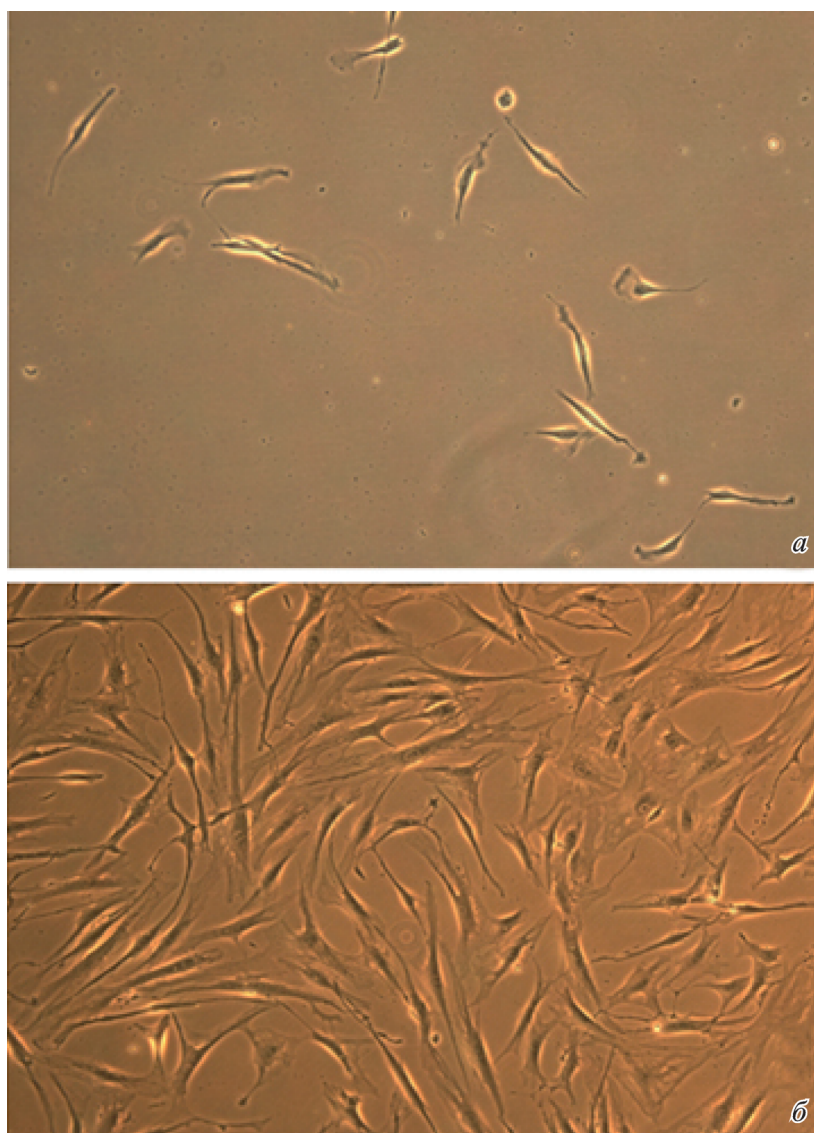


Рис. 1. Морфология клеток, выделенных из подкожно-жировой ткани человека, подвергнутой низкотемпературному шоку (-70°C).

a — клетки в культуре на 6-е сут после выделения; *б* — монослой клеток на 18-е сут культивирования. Нативные препараты. Об. $20\times$, ок. $10\times$.

льда. ПЖТ, полученная в результате липоаспирации, подвергнутая такой обработке, была изучена на предмет наличия в ней популяции жизнеспособных клеток. Окраска образцов полученных клеточных суспензий трипановым синим выявила 100%-ную гибель клеток. Однако после посева выделенных суспензий через 48 ч на пластике были видны единичные прикрепленные клетки среди большого числа погибших клеток и их обломков. Срок хранения липоаспирата в условиях -70°C без криопротектора не влиял на число жизнеспособных клеток, прикрепившихся к культуральному пластику.

Морфологический анализ продемонстрировал гомогенность полученной клеточной популяции. Она была представлена маленькими веретенообразными клетками с негранулированной цитоплазмой (рис. 1, *a*). Клетки пролиферировали и через 18 сут формировали монослой (рис. 1, *б*). По морфологии эти клетки были схожи с клетками, описанными ранее Колгером и соавторами (Colter et al., 2001), которые показали, что в стромальной популяции клеток КМ человека присутствуют быстро самооб-

новляющиеся маленькие клетки, названные RS-1 и RS-2, которые являются предшественниками коммитированных форм ММСК. Цитофлуориметрический анализ (данные по 5 донорам) показал, что клетки положительно окрашивались АГ против АГ, которые являются маркерами ММСК человека: CD29, CD44, CD49a, b, d, CD73, CD90, CD105, CD166 и HLA ABC. На клетках не были выявлены АГ CD34, CD45 — маркеры клеток крови, CD31 — маркер эндотелиальных клеток, Stro-1 — маркер ММСК, а также АГ главного комплекса гистосовместимости II класса, маркеры моноцитов и В-лимфоцитов — HLA DR, HLA DP и HLA DQ. Доля клеток, положительно окрашенных АГ против АГ CD117 (рецептор фактора стволовых клеток c-kit), составляла в среднем 3 %. На рис. 2 представлены гистограммы, отражающие экспрессию поверхностных АГ у клеток, выделенных от одного из доноров. Считается, что ММСК, выделенные из КМ, а также других соединительных тканей, характеризуются высокой экспрессией АГ CD29, CD44, CD49a-f, CD51, CD73, CD105, CD106, CD166 и Stro-1 (Phinney, Prockop, 2007).

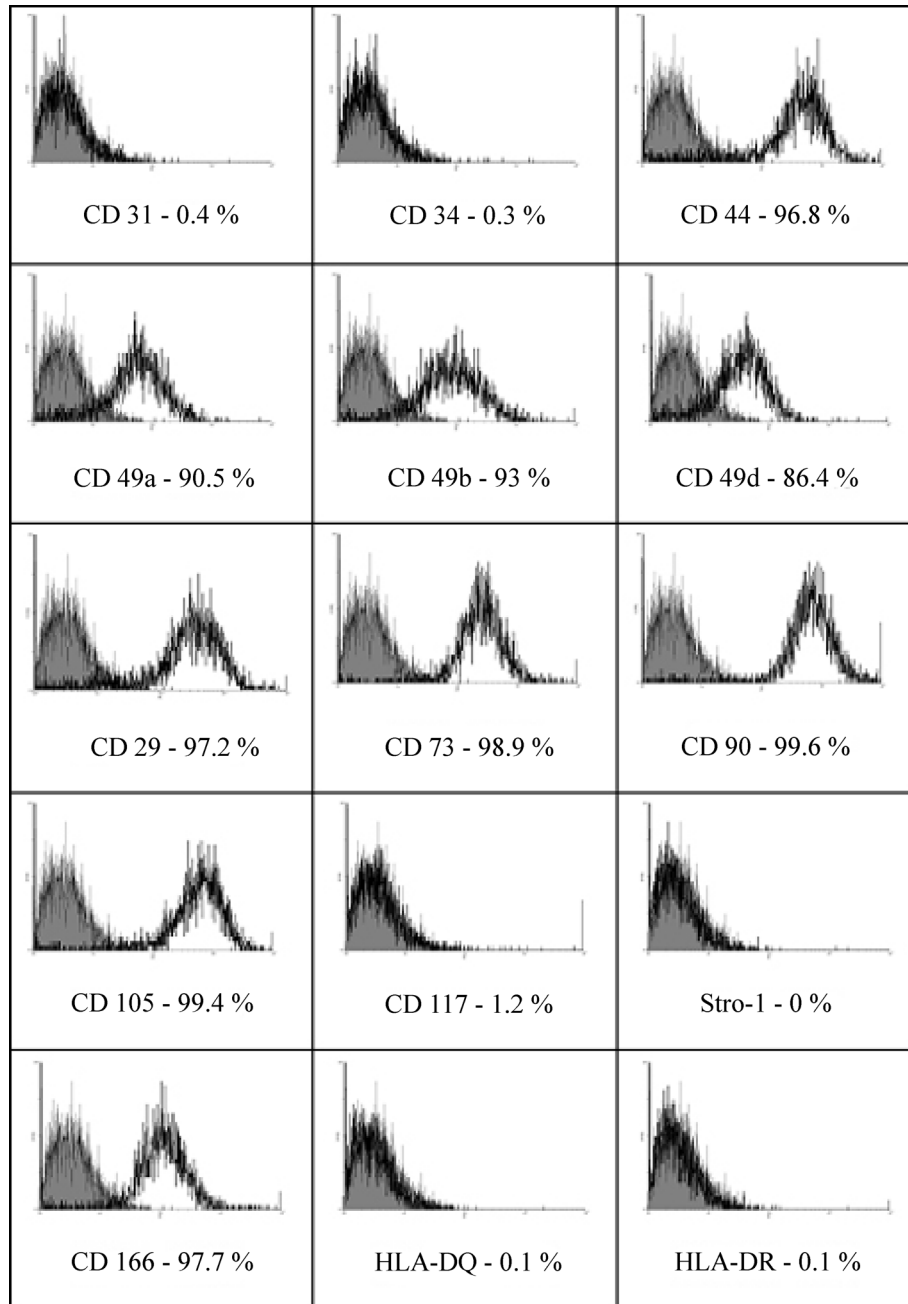


Рис. 2. Экспрессия АГ на поверхности клеток, выделенных из подкожно-жировой ткани человека, подвергнутой низкотемпературному шоку.

Серый цвет гистограммы — контрольное окрашивание клеток, меченных ФЭ; белый цвет гистограммы — окрашивание клеток специфическими АГ.

Анализ полученных нами результатов показал, что в отличие от других субпопуляций ММСК клетки не окрашивались АГ против Stro-1, экспрессия которого характерна для коммитированных к остеогенезу ММСК. Это еще раз свидетельствует о схожести полученных нами клеток с клетками RS, которые также были отрицательны по экспрессии данного АГ.

Дальнейшая характеристика выделенной популяции клеток выявила их мультипотентность. При индукции к дифференцировке *in vitro* они показали способность формировать клетки, подобные клеткам костной, жировой и хрящевой тканей. Культивирование клеток в адипогенной среде приводило к формированию кластеров адипоцитов.

Морфологическая оценка подтверждалась при окраске экспериментальных образцов специальными красителями (Oil Red O) (рис. 3, а). При культивировании в среде, индуцирующей дифференцировку в клетки костной ткани, наблюдали формирование минеральных комплексов, которые выявлялись при окраске von Kossa и ализариновым красным (рис. 3, б). Агрегация клеток с последующим культивированием в индукционной среде приводила к формированию в пробирке трехмерных кусочков. Гистологический анализ полученных образцов, окрашенных гематоксилин-эозином, выявил изменения в морфологии клеток по сравнению с контрольными образцами. В экспериментальных образцах клетки имели морфологию,

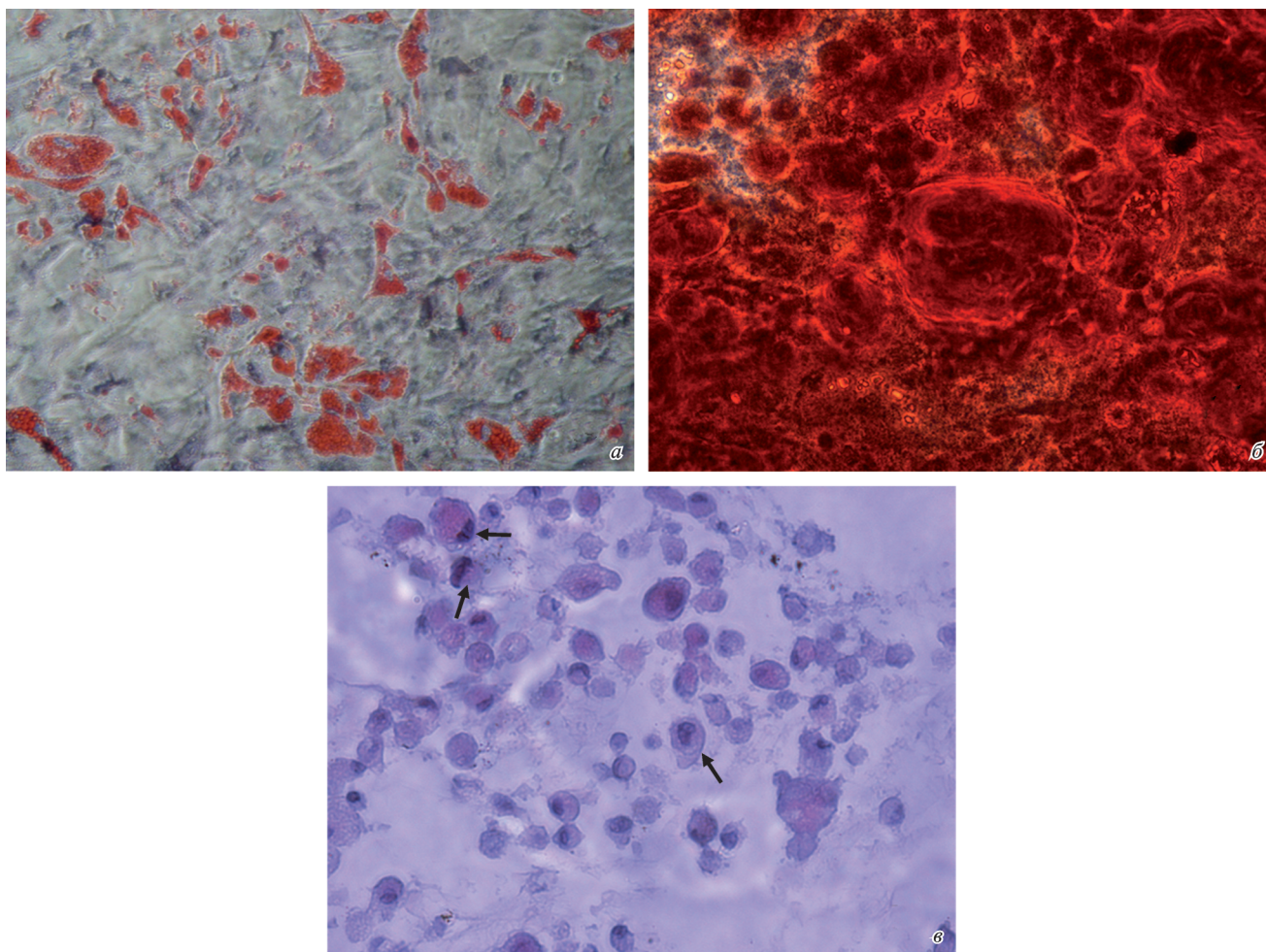


Рис. 3. Дифференцировка клеток, выделенных из подкожно-жировой ткани человека, подвергнутой низкотемпературному шоку (-70°C), в направлении остео-, адипо- и хондрогенеза.

a — клетки, культивируемые в адипогенной среде, на 21-е сут, окраска Oil Red; *б* — клетки, культивируемые в остеогенной среде, на 28-е сут, окраска алizarинным красным; *в* — парафиновый срез клеток после агрегации, культивируемых в хондрогенной среде 28 сут, окраска гематоксилин-эозином. Стрелками указаны изогенные группы из 2 клеток, которые заключены в капсулу лакуны. Увел.: *a, б* — об. $20\times$, ок. $10\times$; *в* — об. $63\times$, ок. $10\times$.

схожую с клетками гиалиновой хрящевой ткани на разной стадии развития. Были обнаружены (рис. 3, *в*) крупные и более мелкие овальные клетки, которые имели палочковидное ядро, что характерно для молодых и зрелых хондроцитов (Кузнецов и др., 2002). Более того, имело место образование изогенных групп, содержащих 2 клетки, заключенные в капсулу лакуны, представленной межклеточным веществом, что также свидетельствует о дифференцировке в направлении хондрогенеза (Kuettner et al., 1982).

Появляются сообщения о возможности спонтанной иммортализации ММСК человека в течение длительного культивирования, а также после длительного хранения в азоте (Rubio et al., 2005; Miura et al., 2006). В нашем эксперименте клеточная популяция была выделена из ткани, подвергнутой изначально физиологическому шоку. Поэтому представляло интерес изучить кариотип клеток на ранних пассажах культивирования. Результаты проведенных исследований, включая анализ 36 метафазных пластинок, не выявили хромосомных мутаций. Дифференциальная окраска не обнаружила структурных перестроек хромосом. Выделенные нами популяции клеток имели диплоидный кариотип $46, XX$ (рис. 4) или $46, XY$.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что в ПЖТ человека в экстремальных для организма условиях сохраняется популяция жизнеспособных клеток с диплоидным кариотипом и фенотипом, подобным ММСК. Полученная популяция клеток имела характеристики, схожие с ранее выделенными нами ММСК из ПЖК (Тепляшин и др., 2005а). В отличие от них полученная популяция была гомогенна по своему составу и не имела примеси эндотелиальных и гемопоэтических клеток. По морфологии, экспрессии Stro-1 и дифференцировке в направлении остео-, адипо- и хондрогенеза выделенная нами клеточная популяция имела схожесть с быстро самообновляющимися клетками RS-2, выделенными из КМ человека ранее Колтером и соавторами (Colter et al., 2000, 2001). Выделили ли мы новую популяцию клеток из подкожного жира, которые более устойчивы к экстремальным условиям, или это особенность ткани способствовать сохранению жизнеспособной популяции, подвергнутой низкотемпературному шоку? Существует мнение о том, что использование липидов способствует сохранению клеток во время процедур замораживания—хранения—оттаивания. Эти липиды, кроме всего прочего, могут также участвовать в репарации



Рис. 4. Диплоидный кариотип (46, XX) клеток, выделенных из подкожно-жировой ткани человека, подвергнутой низкотемпературному шоку (-70°C) 2-й пассаж (метод GTG-окрашивания).

мембран клеток, поврежденных в процессах замораживания—оттаивания. Андреев с соавторами (2008) показали, что липидные препараты могут служить компонентами криозащитных растворов, так как могут эффективно влиять на форму и размер микрочастиц льда. Анализ данных, представленных в литературе, показал, что предпринимаются попытки получить жизнеспособные клетки из тканей животных, подвергнутых глубокому замораживанию без криозащитного вещества (Li, Mombaerts, 2008; Loi et al., 2008; Wakayama et al., 2008; Hoshino et al., 2009). Следует заметить, что такие клетки используются в экспериментах по переносу ядер в энуклеированный ооцит. Известно, что для этих целей достаточно иметь неповрежденное ядро клетки. Более того, в последней работе (Hoshino et al., 2009) авторы выделили из ткани семенного канатика, замороженного без криопротектора, клетки как с фибробластоподобной, так и с эпителиоподобной морфологией. Авторы предполагают, что эти клетки могли быть выделены из кровеносных сосудов, жировой, нервной, мышечной или соединительной ткани семенного канатика. С другой стороны, ранее были получены фибробласты (Roth et al., 1992) из ткани легкого, замороженного без криопротектора. Также выделены клетки из фрагментов кости человека (Heuyligers, Klein-Nulend, 2005) и клетки с фенотипом, подобным эпидермальным стволовым клеткам из эпидермиса кожи (Кульнева и др., 2008). Полянская с соавторами (1990) сообщили о клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунтжака, которая отличалась от большинства клеточных линий тем, что могла переживать криоконсервацию в отсутствие криопротек-

торов. В связи с этим можно предположить, что наличие жизнеспособной популяции клеток с характеристиками ММСК в ткани, подвергшейся низкотемпературному шоку, не является особенностью подкожного жира. Эти клетки могут иметь особое значение для сохранения генетических ресурсов в экстремальных условиях, а низкотемпературный шок может представлять интерес как способ получения гомогенной популяции клеток с характеристиками ММСК (Савченкова, 2008).

Список литературы

- Андреев А. А., Андреева Л. А., Тараховский Ю. С., Салихов И. С. 2008. Замерзание водных растворов в присутствии липосом. *Биофизика живой клетки*. 9 : 20.
- Кузнецов С. Л., Мушкамбаров Н. Н., Горячкина В. Л. 2002. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии. М.: Мед. информ. агентство. 374 с.
- Кульнева Е., Шарифуллина С. З., Чушикова Н. И., Коржикова С. В., Тепляшин А. С. 2008. Выделение и характеристика клеток человека, подобных эпидермальным стволовым клеткам, полученных из ткани кожи после глубокого замораживания. *Цитология*. 50 (9) : 812—813.
- Пирс Э. 1962. *Гистохимия*. М.: Изд-во иностр. лит. 1031 с.
- Полянская Г. Г., Семенова Е. Г., Шубин Н. А. 1990. Влияние криоконсервации на цитогенетические характеристики клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунтжака. *Цитология*. 32 (3) : 256—265.
- Савченкова И. П. 2008. Низкотемпературный шок, как способ выделения из жировой ткани жизнеспособной клеточной популяции с характеристиками мультипотентных мезенхим-

ных стромальных клеток. Биофизика живой клетки. 9 : 111—112.

Савченкова И. П., Ростовская М. С., Чуликова Н. И., Шарифуллина С. З., Тепляшин А. С. 2008. Дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, выделенных из костного мозга и подкожно-жировой клетчатки человека, в клетки костной ткани. Цитология. 50 (10) : 855—860.

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

Тепляшин А. С., Чуликова Н. И., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Ростовская М. С., Савченкова И. П. 2005б. Сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам, выделенных из разных участков подкожно-жировой клетчатки. Цитология. 47 (7) : 637—643.

Bianco P., Robey P. G., Simmons P. J. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell. 2 : 313—319.

Colter D. C., Class R., DiGirolamo C. M., Prockop D. J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. PNAS. 97 : 3113—3218.

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

D'Ippolito G., Diabira S., Howard G. A., Menei P., Roos B. A., Schiller P. C. 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. J. Cell. Sci. 117 : 2971—2981.

Friedenshtein A. J., Chailakhyan R. K., Gerasimov U. V. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell Tissue Kinet. 20 : 263—272.

Friedenshtein A. J., Kuralesova A. I. 1971. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. Transplant. 12 : 99—108.

Fujita J. 1999. Cold shock response in mammalian cells. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1 : 243—255.

Gronthos S., Franklin D. M., Leddy H. A., Robey P. G., Storms R. W., Gimple J. M. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. J. Cell. Physiol. 189 : 54—63.

Heyligers I. C., Klein-Nulend J. 2005. Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. Cell Tissue Bank. 6 : 25—31.

Horwitz E. M., Le Blanc K. L., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Deans R. J., Krause D. S., Keating A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 7 : 393—395.

Hoshino Y., Hayashi N., Taniguchi S., Kobayashi N., Sakai K., Otani T., Iritani A., Saeki K. 2009. Resurrection of a bull by cloning

from organs frozen without cryoprotectant in a -80°C freezer for a decade. Plos ONE. 4 : e4142.

Huckins C., Oakberg E. F. 1978. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. II. The irradiated testes. Anat. Rec. 192 : 529—542.

Kucia M., Reza R., Campbell F., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M. Z. 2006. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4⁺, SSEA-1⁺, Oct-4⁺ stem cells identified in adult bone marrow. Leukemia. 20 : 857—869.

Kuettner K., Pauli B., Gall G., Memoli V., Schenk R. 1982. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. J. Cell Biol. 93 : 743—750.

Li J., Mombaerts P. 2008. Nuclear transfer-mediated rescue of the nuclear genome of nonviable mouse cells frozen without cryoprotectant. Biol. Reprod. 79 : 588—593.

Loi P., Matsukawa K., Ptak G., Clinton M., Fulka J. J. 2008. Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. PLoS ONE 3 : e2978.

Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H. M., Molinolo A. A., Fu B., Patel V., Seo B. M., Sonoyama W., Zheng J. J., Baker C. C., Chen W., Ried T., Shi S. 2006. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. Stem Cells. 24 : 1095—1103.

Phinney D. G., Prockop D. J. 2007. Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. Stem Cells. 25 : 2896—2902.

Reyes M., Lund T., Lenivik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaille K. M. 2001. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood. 98 : 2615—2625.

Roth M., Soler M., Hornung M., Emmons L. R., Stulz P., Peruchoud A. P. 1992. Cell cultures from cryopreserved human lung tissue. Tissue Cell. 24 : 455—459.

Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M. C., de la Fuente R., Cigudosa J. C., Lloyd A. C., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 65 : 3035—3039.

Tepliyashin A. S., Korjikova S. V., Sharifullina S. Z., Rostovskaya M. S., Chupikova N. I., Vasyunina N. Yu., Andronova N. V., Treshalina E. M., Savchenkova I. P. 2007. Differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells of human bone marrow into cells of cartilage tissue by culturing in three-dimensional OPLA scaffolds. Cell and Tissue Biol. 1 (2) : 125—132.

Vacanti M. P., Roy A., Cortiella J., Bonassar L., Vacanti C. A. 2001. Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals. J. Cell. Biochem. 80 : 455—460.

Wakayama S., Ohta H., Hikichi T., Mizutani E., Iwaki T. 2008. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20°C for 16 years. PNAS USA. 105 : 17318—17322.

Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol. Biol. Cell. 13 : 4279—4295.

Поступила 12 I 2010

HUMAN SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE SUBJECTED TO COLD SHOCK AS A SOURCE
OF VIABLE CELLULAR POPULATION WITH CHARACTERISTICS OF MULTIPOTENT
MESENCHYMAL STROMAL CELLS

I. P. Savchenkova,¹ *S. V. Korjikova*²

¹ Ya. R. Kovalenko All-Russian State Research Institute of Experimental Veterinary RAAS
and ² Institute of Stem Cell, Moscow;
e-mail: s-ip@mail.ru

Cellular population with characteristics of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) was isolated from subcutaneous adipose tissue frozen without any cryoprotectant at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Under critical for the adipose tissue condition, the cells retained their viability *in vitro* and ability of adhesion to plastic. Cellular population was homogeneous and represented by small cells ($d = 7\text{ }\mu\text{m}$) with fibroblast-like morphology. Cells were positively stained with Abs for the Abs: CD29, CD44, CD49a, b, d, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA ABC. Cells were negative for CD34, CD45 — markers of hematopoietic cells, CD31 — marker of endothelial cells, Stro-1, as well as for HLA DR, DP, DQ (flow cytometer analysis). Being induced to differentiate *in vitro*, the cells were able to differentiate into cells similar to cells of bone, adipose and cartilage tissue. Karyological assay of the cells isolated from human adipose tissue subjected to cold shock revealed diploid set of chromosomes, 46, XX, without aneuploidy and structural reconstructions of chromosomes. Thus, it has been established that, under extreme condition for the organism, the population of cells with a phenotype similar to multipotent mesenchymal stromal cells is preserved in subcutaneous adipose tissue.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, subcutaneous adipose tissue, cold shock, viability, cellular population, homogeneity, gene expression, differentiation.
