

## ИЗМЕНЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОДКОЖНО-ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА, В РЕЗУЛЬТАТЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© И. П. Савченкова,<sup>1,\*</sup> Е. А. Савченкова, М. И. Гулюкин

*Всероссийский научно-исследовательский институт  
экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко РАН, Москва, 109428;  
\* электронный адрес: s-ip@mail.ru*

Охарактеризованы мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), выделенные из подкожно-жировой ткани (ПЖТ) человека, в условиях длительного культивирования. В трех культурах, прошедших более 50 удвоений обнаружены клетки с отсутствием контактного торможения по достижении ими монослоя. Кариологический анализ (метод GTG-окрашивания) продемонстрировал диплоидный набор хромосом клеток без анеуплоидии и структурных перестроек. Цитофлуориметрический анализ 20 поверхностных антигенов на ранних и поздних пассажах культивирования ММСК выявил изменения доли клеток, положительно окрашенных антителами против следующих маркеров: CD10 (цинкозависимой металлопротеиназы), CD34 (сиаломуцина), CD49 a, d, f (соответственно интегринов  $\alpha 1$ ,  $\alpha 4$  и  $\alpha 6$ ) и CD71 (рецептора трансферрина). Длительное культивирование влияло на адгезию клеток к белкам внеклеточного матрикса (ВКМ), представленным коллагеном, фибронектином и ламинином, которые являются лигандами к  $\alpha$ -интегринам, а также на функциональные способности ММСК формировать при индукции клетки жировой и костной тканей *in vitro*. Обнаруженные закономерности способствуют расширению знаний о поведении клеток в культуре и позволяют приблизиться к более глубокому пониманию процессов, происходящих с клетками-предшественниками в условиях *in vitro*.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, подкожно-жировая ткань, длительное культивирование, экспрессия поверхностных антигенов, хромосомы, белки внеклеточного матрикса, адгезия, дифференцировка.

**Принятые сокращения:** ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ПЖТ — подкожно-жировая ткань, СКПК — сыворотка крови плодов коров.

Стромальные клетки, выделенные из подкожно-жировой ткани (ПЖТ), обладают свойствами и признаками, схожими с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК), выделенными из костного мозга человека (Zuk et al., 2001; Teplyashin et al., 2004b; Тепляшин и др., 2005a). В настоящее время ММСК из ПЖТ рассматриваются как перспективный материал для регенеративной и восстановительной медицины, которая требует его стандартизации и безопасности (Bougin et al., 2013). Известно, что перевод клеток в культуру необходим с целью наращивания клеточной массы. Поиск оптимальных условий культивирования (использование бессывороточных сред, добавление факторов роста, различных сывороток и т. д.) для эффективного получения большого количества клеток имеет первостепенное значение (Tonti, Mannello, 2008). Не менее важным является изучение молекулярно-генетических свойств ММСК в условиях длительного культивирования. Решение этого вопроса позволит приблизиться к более глубокому пониманию процессов, происходящих с клетками-предшественниками в условиях *in vitro*. Накапливаются данные о том, что в процессе культивирования в ММСК могут произойти изменения, обусловленные генетическими

дефектами, которые усиливают риск малигнизации ММСК (Redaelli et al., 2012). Так как геном этих клеток считается относительно стабильным, о чем свидетельствуют обширные данные по их использованию в клинике, высказывается мнение, что ММСК в культуре подвергаются жесткой эпигенетической регуляции, которая контролирует риск трансформации клеток, вызванный генетическими факторами (Wagner, 2012). Все это свидетельствует о том, что микроокружение играет ключевую роль в условиях культивирования клеток. В передаче пространственной информации от микроокружения к клетке участвуют сложные мембранные молекулы, которые в зависимости от сигнала способствуют клеточной адгезии, миграции, пролиферации или дифференцировке, а также гибели клетки. Имеющиеся в литературе данные не до конца раскрывают роль выявленных к настоящему времени сигнальных факторов в определении судьбы стволовой клетки из-за сложности ее взаимодействия с микроокружением. Исследования, посвященные изучению изменения экспрессии некоторых молекул клеточной адгезии на поверхности ММСК, в процессе культивирования по-прежнему немногочисленны.

В связи с этим целью нашей работы было изучить свойства ММСК, выделенных из ПЖТ человека, в процессе длительного культивирования.

### Материал и методика

В эксперименте исследовали 5 образцов липоаспирата ПЖТ (пупочной зоны) человека (женский пол, возраст 33—35 лет). Клетки выделяли из стромально-вазулизированной фракции ПЖТ по методике, описанной ранее (Тепляшин и др., 2005а). Клетки культивировали в среде ДМЕМ с низким (1 г/л) содержанием глюкозы (Gibco Invitrogene, Life Technologies, США), содержащей 10 % сыворотки крови плодов коровы (СКПК) (HyClone, Perbio, Бельгия) и однократный раствор заменимых аминокислот и антибиотиков (Gibco, Invitrogene, Life Technologies, США). Конечная концентрация стрептомицина в среде составляла 50 мкг/мл, а пенициллина — 50 ед./мл. Для длительного культивирования клетки пассировали в плотности  $5 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>. Продолжительность клеточного цикла в исследуемых ММСК определяли на основании данных о времени удвоения количества клеток. Долю клеток в фазе G<sub>0</sub> не учитывали.

Скорость роста клеточных популяций анализировали по динамике изменения числа клеток вплоть до момента образования клетками монослоя. Среднее время удвоения числа клеток рассчитывали по формуле  $t_d = t / \log_2(N_t/N_0)$ , где  $t_d$  — время удвоения числа клеток,  $t$  — время между начальным и конечным подсчетами клеток,  $N_0$  и  $N_t$  — число клеток в начале и конце эксперимента соответственно (Узбеков, 2004). Митотический индекс для каждой популяции клеток рассчитывали в фазе логарифмического роста как отношение числа митозов к общему числу подсчитанных клеток, умноженное на 1000 (в %). Морфологию клеток нативных и на препаратах, окрашенных по Романовскому—Гимзе, оценивали визуально с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Axio-Vision Rel. 4.8.

Экспрессию поверхностных антигенов анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Epics Elite Coulter (США). Для этого клетки снимали с субстрата 0.25%-ным раствором трипсина, подсчитывали, отмывали и аликвоты по  $2 \cdot 10^5$  клеток инкубировали с мышинными антителами против 20 антигенов человека — CD10, CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49 a, b, d, f, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, HLA-ABC, HLA-DQ и HLA-DR (Becton Dickinson, США) в разведении 1 : 30 (D-PBS фирмы Gibco, США, дополненный 2 % СКПК) при 4 °С в течение 45 мин в темноте. В качестве вторых антител использовали антимышинные IgG, меченные фикоэритрином той же фирмы. Анализ проводили в нескольких повторах.

Для оценки адгезии клеток к белкам ВКМ на разных пассажах покровные стекла размером 22×30 мм фирмы Pyrex (Corning, США) предварительно обрабатывали Repell-Silane (Sigma) для придания поверхности гидрофобных свойств. Для предотвращения неспецифического взаимодействия клеток с поверхностью стекла дополнительно покрывали 2%-ным бычьим сывороточным альбумином (в течение 1 ч при 37 °С) с последующей отмывкой D-PBS. Затем покровные стекла покрывали коллагеном, фибронектином или ламинином (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 16 ч

при 4 °С для иммобилизации белков. Клеточную суспензию наносили на предварительно отмытые стекла с лигандами и инкубировали. Эффективность прикрепления оценивали по количеству прикрепившихся клеток на 1 см<sup>2</sup> через 24 ч после посадки при плотности 3000 клеток на 1 см<sup>2</sup> на иммобилизованные белки ВКМ.

Для кариологического анализа клетки на стадии логарифмического роста обрабатывали колхицином (0.6 мкг/мл) в среде в течение 2 ч при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Митотически делящиеся клетки снимали 0.25%-ным раствором трипсина в течение 5 мин при комнатной температуре. После обработки гипотоническим 0.56%-ным раствором KCl в течение 10—15 мин при 37 °С клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 100 g. ММСК фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в объемном соотношении 3 : 1. Полученную суспензию использовали для приготовления препаратов хромосом. Препараты анализировали методом GTG-окрашивания (с предобработкой 0.25%-ным раствором трипсина с последующим окрашиванием красителем Гимза на фосфатном буфере с pH 6.8).

Для изучения способности выделенной клеточной популяции к направленной дифференцировке *in vitro* использовали клетки на 2-м и 17-м пассажах культивирования. Дифференцировку клеток в клетки костной ткани проводили, как было описано ранее (Савченкова и др., 2008). В качестве индукционной среды использовали ДМЕМ, содержащую 10 % СКПК, дексаметазон ( $10^{-7}$  М), β-глицерофосфат (10 мМ) и аскорбиновую кислоту (0.2 мМ). Индукционную среду меняли каждые 4 сут в течение 28 сут. Спустя 28 сут после начала индукции клетки фиксировали ледяным метанолом в течение 5—6 мин и окрашивали ализариновым красным S.

Дифференцировку клеток в клетки жировой ткани проводили по методике, описанной ранее (Тепляшин и др., 2005б). Адипогенной средой была ДМЕМ, содержащая 10 % СКПК,  $10^{-7}$  М дексаметазона и  $10^{-9}$  М инсулина. Через 3 нед клетки фиксировали и окрашивали жировым красным O в течение 10—5 мин.

### Результаты и обсуждение

Среднее время удвоения популяции ММСК составляло 40—52 ч. В экспериментах использовали клетки на 2-м и 17-м пассажах культивирования, что соответствовало 6-й и 51-й генерациям. Морфологических различий между ММСК, выделенных из пяти образцов ПЖТ человека, на ранних пассажах культивирования не было выявлено. Клеточные популяции были представлены узкими веретенообразными клетками с фибробластоподобной морфологией (рис. 1, а). В результате длительного культивирования в двух клеточных популяциях на 7-м и 10-м пассажах были отмечены изменения клеточной морфологии, которые заключались в укрупнении и уплощении клеток (рис. 1, б). Такие клетки росли с каждым пассажем все медленнее, и интервал между пассажами увеличивался, что могло свидетельствовать о старении культур. В трех других клеточных популяциях морфологических изменений в клетках на этих этапах не было выявлено. Они преодолевали более 55 генераций. Однако отмечено, что в этих клеточных популяциях в процессе длительного культивирования появляются клетки, которые теряют свойства контактного торможения. Некоторые клетки не останавливали рост при контакте с други-

ми клетками, что выражалось в размножении их по верху уже сформированного клеточного монослоя (рис. 1, а). При этом митотический индекс не увеличивался (данные приведены в табл. 1). В связи с этим мы провели их цитогенетический анализ.

Результаты кариологического анализа (табл. 1) не выявили генетических изменений в клетках, связанных с нарушениями в хромосомах, которые возможны в длительно перевиваемых культурах. Так, анализ клеток на 2-м и 17-м пассажах обнаружил 31 пластинку из 32 на 2-м пассаже и 29 из 30 на 17-м у донора 1; по 29 пластинок на обоих пассажах у донора 2 и все подсчитанные метафазные пластинки у донора 3 имели диплоидный кариотип 46, XX. В трех метафазных пластинках при кариотипе 45, XX отсутствовали разные хромосомы, что свидетельствует о том, что 45, XX — результат методической потери по одной хромосоме из набора хромосом. Спонтанной анеуплоидии и полиплоидии в тестируемых культурах не выявили. Дифференциальная окраска не обнаружила структурных перестроек хромосом.

Цитофлуориметрический анализ выявил на поверхности ММСК наличие АГ, экспрессия которых характерна для ММСК человека. Считается, что ММСК, выделенные из ПЖТ, характеризуются высокой экспрессией CD29, CD44, CD49 a, d, CD51, CD73, CD105, CD106 и CD166 (Zuk et al., 2001; Тепляшин и др., 2005a; Mitchel et al., 2006; Lin et al., 2010; Baer, Geiger, 2012; Bourin et al., 2013; Zimmerlin et al., 2013).

В табл. 2 представлены результаты, отражающие экспрессию 20 поверхностных антигенов у одной и той же культуры клеток на 2-м и 17-м пассажах культивирования (данные по трем культурам). На ранних и поздних пассажах ММСК не различались по экспрессии следующих антигенов — CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 и HLA ABC. На 2-м пассаже в клеточных популяциях было выявлено несущественное число клеток, которые окрашивались антителами против CD45 (общего лейкоцитарного антигена) — маркера клеток крови, CD31 (PECAM) — маркера эндотелиальных клеток, а также антигена главного комплекса гистосовместимости класса II, характерных для моноцитов и В-лимфоцитов — HLA-DR, HLA-DQ. На 17-м пассаже было отмечено исчезновение клеток с таким фенотипом, что могло свидетельствовать об очистке ММСК от незначительной примеси клеток с эндотелиальными и гематопозитическими свойствами во время длительного культивирования. Сравнение ММСК, выделенных из ПЖТ человека, по экспрессии поверхностных антигенов у свежесделанных и во время их культивирования было выполнено ранее другими авторами (Guilak et al., 2006; Yoshimura et al., 2006; Astori et al., 2007; Varma et al., 2007). К сожалению, следует констатировать, что до сих пор нет гена-маркера, экспрессия которого была бы специфична для клеток этого типа. Недавно были предприняты попытки стандартизировать клеточные популяции, выделенные из жировой ткани человека (Baer, Geiger, 2012; Bourin et al., 2013). Считается, что в отличие от ММСК, выделенных из других тканей, в том числе из костного мозга, на этих клетках не обнаруживаются CD11b, CD45 (меньше 2 %) и CD106 (VCAM-1), но наблюдается высокая экспрессия CD13, CD73 и CD90 (больше 90 %).

Ранее мы сообщали о том, что в клеточной популяции, выделенной из ПЖТ человека, могут присутствовать клетки с фенотипом CD34<sup>+</sup> (Тепляшин et al., 2004a; Тепляшин и др., 2005б). Эти клетки были выделены из образ-

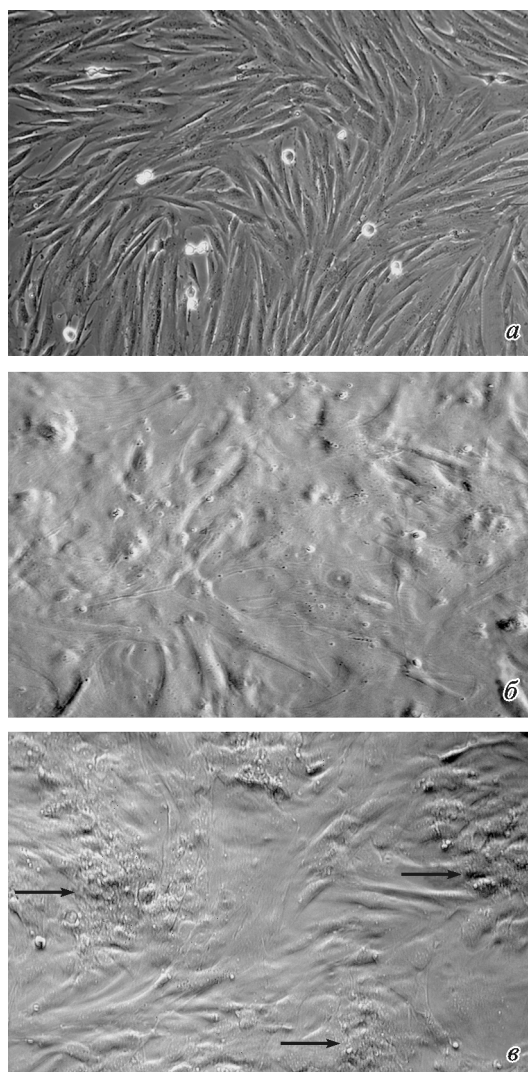


Рис. 1. Морфологические изменения ММСК в монослоях на ранних и поздних пассажах культивирования.

а—в — пассажи 2, 10 и 17 соответственно. Стрелкой (в) показана потеря клетками контактного торможения. Об. 20×.

цов ПЖТ, взятой из разных участков тела во время липоаспирации (пупочная зона) и блефаропластики (нижнее веко). Как видно из результатов настоящей работы, представленных в табл. 2, на раннем (2-м) пассаже из трех популяций ММСК, выделенных из ПЖТ, одна (3-я) превышала две другие популяции по доле клеток, связавших антитела против CD34, на 24.2 и 20.4 % соответственно. Так как в настоящей работе клетки выделяли из ПЖТ, взятой во время липоаспирации (пупочная зона) с помощью одного и того же способа, полученные результаты могут свидетельствовать об индивидуальных особенностях доноров. В процессе длительного культивирования во всех образцах наблюдали снижение числа клеток CD34<sup>+</sup>.

Данные по выявлению CD34 на поверхности ММСК, выделенных из ПЖТ человека, остаются противоречивыми. Считается, что в популяции клеток с фенотипом CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> его экспрессия меняется в зависимости от условий культивирования (Mitchell et al., 2006). Имеются наблюдения, экспрессия CD34 выявляется на ММСК из ПЖТ на ранних пассажах культивирования, а затем снижается (Lin et al., 2010; Maumus et al., 2011). Высказыва-

Т а б л и ц а 1

**Цитогенетический анализ ММСК, выделенных из ПЖТ человека, на раннем и позднем пассаже культивирования**

Донор	Пассаж	Число метафазных пластинок	Метафазы/число клеток	МИ, ‰	Число случайных потерь хромосом	Нормальный кариотип (%)
1 (46, XX)	2	32	19/1000	2.0	1	99
	17	30	15/1000	1.9	1	99
2 (46, XX)	2	30	23/1000	2.3	1	99
	17	29	19/1200	2.0	0	100
3 (46, XX)	2	31	30/1011	2.9	0	100
	17	28	11/1000	2.1	0	100

Примечание. МИ — митотический индекс.

ется мнение о том, что клетки CD34<sup>+</sup>, выделенные из жировой ткани человека с выраженными адгезивными свойствами, могут быть перидитами (Traktuev et al., 2008).

Интересные данные были получены по экспрессии поверхностной клеточной металлопротеиназы (CD10) и рецептора трансферрина (CD71). Во всех трех культурах ММСК в процессе длительного культивирования нами было выявлено увеличение числа клеток, связывающих антитела против этих антигенов. CD10 — это цинкозависимая металлопротеиназа на клеточной мембране с мол. массой 90—110 кДа, которая была выявлена как опухоле-

зависимый АГ при лимфоцитарной лейкемии человека и других формах опухолей (Ogava et al., 2002). В норме CD10 выявляется на поверхности клеток различных тканей, включая гранулоциты, клетки Шванна, миоэпителиальные клетки, лимфоидные зародышевые клетки, клетки эмбрионального трофобласта, железистого эпителия и др. В стромальных клетках, выделенных из костного мозга, эндометрия матки и подкожного жира человека, также обнаруживается этот антиген. Накапливаются данные, которые демонстрируют роль CD10 в гомеостазе и неопластических изменениях клеток и развитии опухоли

Т а б л и ц а 2

**Сравнительный анализ экспрессии поверхностных антигенов (АГ) на ММСК, выделенных из ПЖТ человека, во время длительного культивирования**

АГ	Доля клеток (%), положительно окрашенных антителами против АГ на 2-м и 17-м пассажах					
	популяция 1, пассаж		популяция 2, пассаж		популяция 3, пассаж	
	2	17	2	17	2	17
CD10	69.9	82.3	76.3	89.1	86.6	94.1
CD13	99.2	99.1	99.3	99.0	99.5	99.8
CD29	98.3	98.3	99.1	99.0	98.9	98.0
CD31	7.0	2.1	3.3	0.5	5.1	0.1
CD34	0.1	0.1	3.9	0.7	24.3	0.8
CD44	98.9	98.3	98.8	98.5	98.7	98.6
CD45	1.9	0.1	3.2	0.5	5.5	0.2
CD49a	85.2	3.2	96.2	6.7	84.6	0.1
CD49b	96.4	95.9	97.3	98.0	90.1	97.0
CD49d	88.2	80.1	89.6	88.6	79.0	73.0
CD49f	32.3	43.0	44.7	51.4	31.3	42.9
CD71	86.9	88.1	83.5	90.6	69.0	85.5
CD73	99.1	99.0	98.7	97.9	98.4	99.3
CD90	99.8	99.3	99.1	99.0	98.6	99.5
CD105	99.2	91.4	97.5	93.8	96.7	92.8
CD106	6.1	0.3	10.1	1.8	6.9	0.1
CD166	98.3	97.6	97.0	97.9	93.8	95.5
HLA-ABC	99.4	99.4	98.4	98.1	98.0	98.3
HLA-DQ	0.3	0.0	0.2	0.0	2.7	0.1
HLA-DR	0.1	0.0	4.2	0.5	1.2	0.0

Примечание. Представлены данные для трех популяций одной и той же культуры ММСК.

(Huang et al., 2005; Braham et al., 2006; Masloub et al., 2011). Увеличение экспрессии CD10 может быть использовано в качестве маркера клеточного перерождения в туморогенном направлении (Oba et al., 2011). Таким образом, нельзя исключить, что увеличение во всех образцах доли клеток, несущих CD10, с увеличением длительности культивирования может быть связано с их малигнизацией.

Известно, что CD71 (рецептор трансферрина) обеспечивает входение в активированную клетку ионов железа, необходимого для деления клеток, и обнаруживается на большинстве делящихся клеток (Aisen et al., 2004). Рост доли клеток, на поверхности которых выявлен этот антиген в процессе длительного культивирования, мог бы свидетельствовать об увеличении числа делящихся клеток. Однако мы наблюдали уменьшение числа митозов в процессе длительного культивирования (табл. 1).

Недавно появилась работа, в которой ММСК выделяли из стромальной фракции образцов ПЖТ человека, полученных при липосакции разными методами (механическом и под действием ультразвука); фенотип ММСК сравнили по экспрессии 242 поверхностных антигенов (Bajek et al., 2015). Авторы показали, что различные методы липосакции не влияют на экспрессию поверхностных антигенов. На клетках были выявлены такие антигены, как CD9, CD10, CD34, CD44, CD49d, CD54, CD55, CD59 и CD71. Считается, что различия в описании фенотипических маркеров ММСК могут быть обусловлены индивидуальными особенностями доноров, их принадлежностью к этнической группе, возрастом, условиями культивирования и временем культивирования. В наших экспериментах клетки были выделены из липоаспирата доноров приблизительно одинакового возраста и одной

Таблица 3

**Влияние длительного культивирования ММСК, выделенных из ПЖТ человека, на адгезию к белкам ВКМ**

Пассажи	Число клеток, прикрепленных белку		
	коллаген I	фибронектин	ламинин
2-й	18 000 ± 0.02	16 300 ± 0.07	3200 ± 0.01
17-й	3600 ± 0.12	8170 ± 0.3	6400 ± 0.02

Примечание. Представлены средние значения и их ошибка из трех независимых экспериментов.

этнической группы. Условия выделения и культивирования клеток были также идентичными. В связи с этим можно предположить, что выявленные нами изменения обусловлены длительностью культивирования.

Ранее нами были обнаружены изменения экспрессии четырех интегринов в процессе длительного культивирования (Савченкова, Савченкова, 2014). Анализ полученных результатов подтвердил значительные различия в экспрессии интегринов  $\alpha 1$ ,  $\alpha 4$  и  $\alpha 6$  (табл. 2). Результаты сравнительного анализа ММСК на 2-м и 17-м пассажах культивирования выявили значительное снижение количества клеток, положительно меченных антителами против CD49a (интегрин  $\alpha 1$  — рецептора коллагена и ламинина) и CD49d (интегрин  $\alpha 4$  — рецептора фибронектина). Доля клеток, положительно окрашенных антителами против CD49f (интегрин  $\alpha 6$  — рецептора ламинина), наоборот, увеличивалась в течение длительного культивирования.

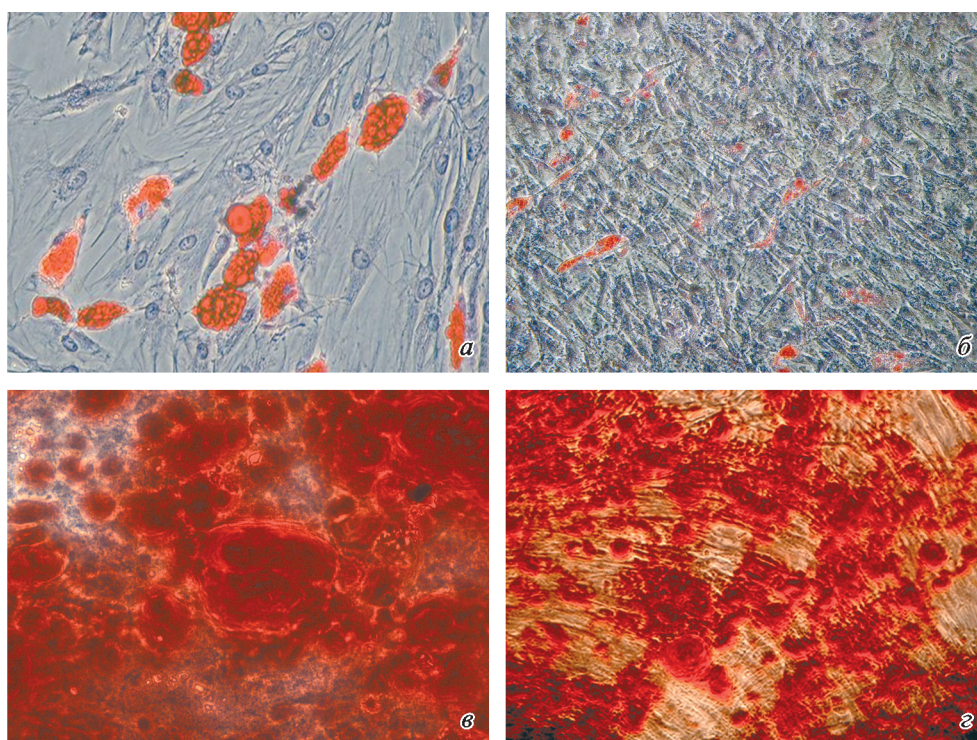


Рис. 2. Влияние длительного культивирования на способность ММСК, выделенных из ПЖТ человека, дифференцироваться при индукции в адипогенном (а, б) и остеогенном (в, з) направлениях.

а, б — формирование липидных пузырьков (окраска Oil Red O) клетками на 2-м и 17-м пассажах соответственно; в, з — окраска ализариновым красным S на 2-м и 17-м пассажах соответственно. Об. 20×.

Так как белки ВКМ являются лигандами к  $\alpha$ -интегринам, представляло интерес оценить эти клетки по адгезии и распластыванию к матрицам, представленным коллагеном типа 1, фибронектином и ламинином. Как видно из результатов, представленных в табл. 3, для ММСК на ранних пассажах наиболее адгезивными являются коллаген и фибронектин. В наименьшей степени они взаимодействуют с ламинином. Проведенные исследования подтвердили наше предположение о том, что ММСК на ранних и поздних этапах культивирования различаются по адгезии к иммобилизованным белкам ВКМ. Количество клеток на 2-м пассаже, прикрепленных к коллагену и фибронектину, превосходило число клеток на 17-м пассаже в 5 и 2 раза соответственно, в то время как число клеток, адгезируемых к ламинину на 2-м пассаже, было меньше в 2 раза по сравнению с клетками на 17-м пассаже.

Далее изучили влияние длительного культивирования на одну из функциональных характеристик ММСК — способность при индукции образовывать клетки других тканей, имеющих то же происхождение. В результате индукции ММСК, выделенных из ПЖТ, к дифференцировке в остео- и адипогенном направлениях мы обнаружили, что клетки на 17-м пассаже культивирования уступают по эффективности формирования клеток как костной, так и жировой тканей *in vitro* клеткам, которые индуцировали на 2-м пассаже (рис. 2), о чем свидетельствует окраска специфическими красителями. Наши данные согласуются с данными, полученными ранее другими авторами (Kim et al., 2009), которые наблюдали снижение способности формировать клетки костной и жировой тканей при индукции ММСК человека, прошедших в культуре более 60 цитогенераций.

Фенотипические изменения в мезенхимных стволовых клетках, выделенных из костного мозга свиней, в процессе длительного культивирования были описаны ранее (Vacanti et al., 2005). В процессе длительного культивирования клетки теряли также свои функциональные способности. Так, на ранних пассажах культивирования при индукции они формировали клетки хрящевой, костной и жировой тканей, в то время как на поздних пассажах они сохраняли только адипогенный дифференцировочный потенциал. На поздних пассажах в клетках уменьшались активность щелочной фосфатазы, синтез костного морфогенетического белка (BMP-7) и происходило снижение продукции этими клетками цитокинов, необходимых для поддержания гематопоэза: фактора роста стволовых клеток (SCF), фактора, ингибирующего лейкомию (LIF), и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) (Vacanti et al., 2005). Есть данные об увеличении числа апоптотических клеток в культуре ММСК, выделенных из костного мозга, в процессе длительного культивирования (Jeong, Cho, 2016). Влияние длительного культивирования на морфологию и пролиферацию ММСК, выделенных из костного мозга доноров, различающихся между собой возрастом (0—12, 25—50 и более 60 лет), было также показано ранее (Zaim et al., 2012). Результаты демонстрируют, что даже в хорошо стандартизированной культуре некоторые условия (возраст донора, длительность культивирования) могут оказывать влияние на характеристики ММСК, которые необходимо принимать во внимание.

Таким образом, в процессе длительного культивирования ММСК, выделенных из ПЖТ человека, нами выявлены изменения свойств этих клеток. Полученные дан-

ные важны для изучения биологии ММСК в культуре и могут быть полезными для решения вопросов, связанных с их применением.

### Список литературы

Савченкова И. П., Ростовская М. С., Чупикова М. С., 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) : 857—862. (Savchenkova I. P., Rostovskaia M. S., Chupikova N. I., Sharifullina S. Z., Tepliashin A. S. 2008. Osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow and adipose tissue. Tsitologiya. 50 (10) : 855—860.)

Савченкова И. П., Савченкова Е. А. 2014. Изменение экспрессии интегринов мультипотентными мезенхимными стромальными клетками, выделенными из подкожно-жировой ткани человека, в результате длительного культивирования. Цитология. 56 (8) : 574—580. (Savchenkova I. P., Savchenkova E. A. 2014. Change of expression of integrins on multipotent mesenchymal stromal cells isolated from human adipose tissue during long cultivation. Tsitologiya. 56 (8) : 574—580.)

Тепляшин А. С., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Чупикова 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. (Tepliashin A. S., Korzhikova S. V., Sharifullina S. Z., Chupikova N. I., Rostovskaia M. S., Savchenkova I. P. 2005a. Characteristics of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. Tsitologiya. 47 (2) : 130—135.)

Тепляшин А. С., Чупикова Н. И., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Ростовская М. С., Топчиашвили З. А., 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. (Tepliashin A. S., Chupikova N. I., Korzhikova S. V., Sharifullina S. Z., Rostovskaia M. S., Topchiashvili Z. A., Savchenkova I. P. 2005b. Comparative analysis of cell populations with a phenotype similar to that of mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat. Tsitologiya. 47 (7) : 637—643.)

Узбеков Р. Э. 2004. Анализ клеточного цикла и методика исследования динамики уровня экспрессии белков на его различных фазах с использованием синхронизированных клеток. Биохимия. 69 (5) : 597—611. (Uzbekov R. E. 2004. Analysis of protein expression level dynamics in the cell cycle using synchronized cells. Biochemistry (Moscow). 69 (5) : 485—496.)

Aisen P. 2004. Transferrin receptor 1. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 : 2137—2143.

Astori G., Vignati F., Bardelli S., Tubio M., Gola M., Albertini V., Bambi F., Scali G., Castelli D., Rasini V., Soldati G., Mocetti 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. Doi: 10.1186/1479-5876-5-55.

Baer P. C., Geiger H. 2012. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. Stem Cells Int. 812693. Doi: 10.1155/2012/812693.

Bajek A., Gurtowska N., Gackowska L., Kubiszewska I., Bodnar M., Marsza A., Januszewski R., Michalkiewicz J., Drewa T. 2015. Does the liposuction method influence the phenotypic characteristics of human adipose-derived stem cells? Biosci. Rep. 35 art: e00212. Doi: 10.1042/BSR20150067.

Bourin P., Bunnell B. A., Casteilla L., Dominici M., Katz A. J., March K. L., Redl H., Rubin U. J. P., Yoshimura K., Gimble J. M. 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for

Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 15 : 641—648.

Braham H., Trimeche M., Ziadi S., Mestiri S., Mokni M., Amara K. 2006. CD10 expression by fusiform stromal cells in nasopharyngeal carcinoma correlates with tumor progression. *Virchows Arch*. 449 : 220—224.

Guilak F., Lott K. E., Awad H. A., Cao Q., Hicok K. C., Fermor B., Gimple J. M. 2006. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J. Cell. Physiol.* 206 : 229—237.

Huang W. B., Zhou X. J., Chen J. Y., Zhang L. H., Meng K., Ma H. H. 2005. CD10-positive stromal cells in gastric carcinoma: correlation with invasion and metastasis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 35 : 245—250.

Jeong S. G., Cho G. W. 2016. Accumulation of apoptosis-insensitive human bone marrow-mesenchymal stromal cells after long-term expansion. *Cell Biochem. Funct.* 22. Doi: 10.1002/cbf.3191.

Kim J., Kang J. W., Park J. H., Choi Y., Choi K. S., Park K. D., Baek D. H., Seong S. K., Min H. K., Kim H. S. 2009. Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch. Pharm. Res.* 32 : 117—126.

Lin C. S., Xin Z. C., Deng C. H., Ning H., Lin G., Lue T. F. 2010. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol. Histopathol.* 25 : 807—815.

Masloub S. M., Abdel-Aziz A. M., Elhamid E. S. 2011. CD10 and osteopontin expression in dentigerous cyst and ameloblastoma. *Diagn. Pathol.* 6 : 44. Doi: 10.1186/1746-1596-6-44.

Maurus M., Peyrafitte J. A., D'Angelo R., Fournier-Wirth C., Bouloumi'e A., Casteilla L., Sengen'es C., Bourin P. 2011. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int. J. Obes.* 35 : 1141—1153.

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

Oba J., Nakahara T., Hayashida S., Kido M., Xie L., Takahara M. 2011. Expression of CD10 predicts tumor progression and unfavorable prognosis in malignant melanoma. *J. Amer. Acad. Dermatol.* 65 : 1152—1160.

Ogawa H., Iwaya K., Izumi M., Kuroda M., Serizawa H., Koyanagi Y. 2002. Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development. *Hum. Pathol.* 33 : 806—811.

Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J., Riva G., Baronchelli S., Dalprà L., Tredici G. 2012. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of *in vitro* cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 3 : 47.

Teplyashin A. S., Tchupikova N. I., Sharifullina S. Z., Korzhikova S. V., Rostovskaya M. S., Topchiashvilly Z. A., Savchenkova I. P. 2004a. CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> MSC-like cells, derived from adipose tissue of human. In: 7th Int. Congress Cell Transplant. Soc. Boston, USA. November 17—20. P. 76.

Teplyashin A. S., Tchupikova N. I., Sharifullina S. Z., Rostovskaya M. S., Korzhikova S. V., Abdrakhmanov I. K., Dunaev A. A., Petrin S. A., Eremenko V. S., Savchenkova I. P. 2004b. Characterization of human MSC-like cells isolated from bone marrow, adipose tissue, skin and placenta. In: Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Munster. P. 24.

Tonti G. A., Mannello F. 2008. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int. J. Develop. Biol.* 52 : 1023—1032.

Traktuev D. O., Merfeld-Clauss S., Li J., Kolonin M., Arap W., Pasqualini R., Johnstone B. H., March K. L. 2008. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* 102 : 77—85.

Vacanti V., Kong E., Suzuki G., Sato K., Canty J. M., Lee T. 2005. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J. Cell. Physiol.* 205 : 194—201.

Varma M. J., Breuls R. G., Jurgens W. J., Bontkes H. J., Schuurhuis G. J., van Ham S. M., van Milligen F. J. 2007. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Develop.* 16 : 91—104.

Wagner W. 2012. Implications of long-term culture for mesenchymal stem cells: genetic defects or epigenetic regulation? *Stem Cell Res. Ther.* 3 : 54.

Yoshimura K., Shigeura T., Matsumoto D., Sato T., Takaki Y., Aiba-Kojima E., Sato K., Inoue K., Nagase T., Koshima I., Gonda K. 2006. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* 208 : 64—76.

Zaim M., Karaman S., Cetin G., Isik S. 2012. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann. Hematol.* 91 : 1175—1186.

Zimmerlin L., Donnenberg V. S., Rubin J. P., Donnenberg A. D. 2013. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A.* 83 : 134—140.

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. *Tissue. Eng.* 7 : 211—228.

Поступила 27 I 2017

## CHANGES IN THE MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS ISOLATED FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE DURING LONG-TERM CULTIVATION

I. P. Savchenkova,<sup>1</sup> E. A. Savchenkova, M. I. Gulyukin

Ya. R. Kovalenko All-Russian State Research Institute of Experimental Veterinart Medicine, Moscow, 109428;

<sup>1</sup> e-mail: s-ip@mail.ru

Properties and signs of the multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) isolated from human adipose tissue during long cultivation has been studied. In the three cultures which had passed more than 50 cellular doublings, we found cells with lack of contact inhibition at reaching of monolayer. The karyotyping analysis (GTG staining method) showed a diploid set of chromosomes of cells without aneuploidy and rearrangements. The flow cytometric analysis of 20 surface antigens in early and late passages of MMSCs cultures revealed changes in the share of the cells positively stained with antibodies against the following markers: CD10 (a zinc depended metalloproteinase), CD34 (sialomucin), CD49 a, d, f, ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ -integrins) and CD71 (a transferrin receptor). Prolonged cell cultivation affected their adhesion to proteins of extracellular matrix (ECM) presented

by collagen, fibronectin and laminin which are ligands to  $\alpha$ -integrins, as well as it also had influence on the functional capacity of MMSCs to generate cells of adipose and bone tissues *in vitro*. The observed pattern enhances knowledge about behavior of cells in culture, and gets us closer to a better understanding of the process taking place with the precursor cells in conditions *in vitro*.

**Key words:** multipotent mesenchymal stromal cells, subcutaneous adipose tissue, human, long-term cultures, surface antigens expression, chromosomes, an extracellular matrix proteins, adhesion, differentiation.

---