

СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Ольга Владимировна ПОВЕЩЕНКО, Анатолий Пантелеймонович КОЛЕСНИКОВ, Ирина Иннокентьевна КИМ, Евгений Владимирович УЛЬЯНОВ, Антонина Николаевна МОЗЖЕРИНА, Евгения Викторовна ЯНКАЙТЕ, Татьяна Владимировна ГЕРТЕР, Анастасия Олеговна СОЛОВЬЕВА, Елена Владимировна ЗОНОВА, Александр Фёдорович ПОВЕЩЕНКО, Владимир Иосифович КОНЕНКОВ

ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
6300117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4

В работе были определены оптимальные условия для выделения и экспансии стромально-васкулярной фракции клеток, полученной из жировой ткани человека. Показано, что применение 0,05% раствора коллагеназы способствует выделению $(0,4-0,5) \times 10^6$ клеток из 1 мл жира в ранние сроки и $(0,2-0,3) \times 10^6$ клеток через 18 часов после липоаспирации. Оптимальная плотность клеток составляет $0,5 \times 10^3/\text{см}^2$. Дополнение культуральной среды аутологичной сывороткой в концентрации 10-20% способствует адекватной пролиферации стромально-васкулярной фракции клеток. Клетки жировой ткани, выделенные от больных лимфедемой, не отличаются от клеток здоровых людей ни по количеству, ни по пролиферативному потенциалу.

Ключевые слова: липоаспират, мезенхимальные стромальные клетки, коллагеназа, культивирование.

Введение

Жировая ткань развивается в течение перинатального и постнатального периода жизни человека. Она вовлечена в метаболизм жиров и выполняет энергетическую функцию. Кроме того, жировая ткань является источником плюрипотентных стволовых клеток. Большие изменения в жировой массе достигаются благодаря высококонтролируемым процессам ангиогенеза, рекрутирования прекурсоров, пролиферации, дифференцировки, дедифференцировки, апоптоза. Жировая ткань, полученная при липоаспирации, кроме зрелых адипоцитов содержит стромально-васкулярную фракцию клеток [1], которая является гетерогенной популяцией и включает в себя васкулярные клетки (эндотелиальные, гладкомышечные, циркулирующие клетки крови) и фибробласто-подобные прилипающие к пластику клетки, описанные как мультипотентные мезенхимальные, или стромальные, стволовые клетки (МСК) [2,3]. Впервые МСК описаны в костном мозге, где представляют собой минорную популяцию клеток-предшественников, способную к поддержанию кроветворения и дифференцировке. Впоследствии МСК были выделены и из других

так называемых альтернативных источников, к которым может быть отнесена жировая ткань. Мезенхимальные клетки жировой ткани обладают высокой пластичностью и способны дифференцироваться *in vitro* и *in vivo* не только в клетки тканей мезодермального происхождения (остеобласты, хондроциты, адипоциты), но и в миоциты, кардиомиоциты, нейроны, гепатоциты и др. [1,2,4]. МСК являются предшественниками для эндотелиальных клеток [2,4,5,6,7]. В отличие от костного мозга, жировая ткань более доступна для выделения, а по содержанию МСК не уступает, а иногда и превосходит костный мозг [8]. В литературе достаточно полно определены условия выделения и экспансии МСК костного мозга [9]. Целью данной работы явилась отработка и сравнение адекватных методов выделения и культивирования МСК человека из жировой ткани человека относительно здоровых доноров (липоаспират передней брюшной стенки и паховой области) и липоаспирата у женщин с постмастэктомической лимфедемой верхней конечности.

Материалы и методы

Жировая ткань получена при липоаспирации из подкожножировой клетчатки живота

Повещенко О.В. — старш.н.с., канд.м.н., poveschenkoov@mail.ru

Колесников А.П. — вед.н.с., д.м.н.

Ким И.И. — н.с.

Ульянов Е.В. — аспирант

Мозжерина А.Н. — аспирант

Янкайте Е.В. — аспирант

Гертер Т.В. — аспирант

Соловьева А.О. — аспирант

Зонина Е.В. — зав. отделением терапии, канд.м.н.

Повещенко А.Ф. — зам. директора по НИР, д.м.н.

Коненков В.И. — директор, д.м.н., профессор, академик РАМН

у здоровых доноров, в ходе операции липосакции по поводу постмастэктомической лимфедемы верхней конечности и из паховой области во время операции флебэктомии после подписания информированного согласия в соответствии с протоколом, утвержденным Ученым Советом и стандартами локального этического комитета ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН. Жировая ткань (10–100 мл) интенсивно отмыта от эритроцитов забуференным физиологическим раствором (ЗФР) с антибиотиком (гентамицин) и антимикотиком (амфотерицин В), после чего обработана 0,05–0,1% раствором коллагеназы (Clostridium, тип II, Sigma-Aldrich) при постоянном помешивании при 37° С в течение 30–80 минут. После центрифугирования в течение 15 минут при 1500 об/мин зрелые адипоциты были аспирированы, кусочки тканей удалены фильтрованием через нейлоновые фильтры с размером пор 100 μm (Becton Dickinson). Выделенные клетки инкубировали во флаконах 75 cm^2 (Orange Scientific) в количестве 100–1000 клеток/ cm^2 в культуральной среде ДМЕМ с низким содержанием глюкозы (Биолот, Санкт-Петербург), дополненной 2 мМ L-глутамина, гентамицином и амфотерицином и 10%–20% аутологичной (АС) или фетальной бычьей (FBS) сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург). Культуральные флаконы помещали в CO_2 -инкубатор (37°С, 5% CO_2) на 48 часов, после чего неприлипшие клетки удаляли, а прилипшую фракцию клеток оставляли культивироваться. Среду обновляли каждые 3 дня. По мере роста и достижения субконфлюентного состояния (80–90% слияния) клетки снимали 0,25% трипсином-ЭДТА (Sigma-Aldrich) (пассажи 0), после чего пересевали с плотностью $(3,0\text{--}10,0)\times 10^3/\text{cm}^2$. Осуществляли до 5 пассажей. Для учета экспансии фибробластоподобные клетки снимали и подсчитывали жизнеспособность и количество клеток с витальным красителем (трипановый синий), визуально оценивали морфологию на инвертированном микроскопе, культуры фотографировали. Для получения аутологичной сыворотки 20 мл крови забирали в вакутайнеры без антикоагулянтов, после образования сгустка кровь центрифугировали при 2000 об/мин 15 минут, сыворотку фильтровали через мембраны с размером пор 0,2 μm (Orange Scientific).

Статистическую обработку результатов проводили с применением критерия Манна-Уитни, результаты представлены в виде $M \pm SD$. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

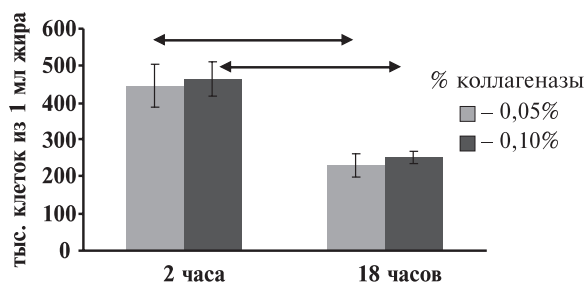


Рис. 1. Количество клеток стромально-васкулярной фракции, выделенных из 1 мл жировой ткани передней брюшной стенки через 2 и 18 часов после липоаспирации. Стрелками обозначены достоверные различия между группами ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Жировая ткань не только является альтернативным источником МСК, но и имеет ряд преимуществ перед костным мозгом в более простом в техническом плане способе забора и в количестве выделенных клеток из единицы объема. В литературе данные о количестве выделенных клеток стромально-васкулярной фракции жира противоречивы и составляют от $0,1 \times 10^6$ до $1,6 \times 10^6$ клеток из 1 мл жира [7,10]. На первом этапе исследования мы определили количество клеток стромально-васкулярной фракции, выделенных ферментативным путем. Из материала, полученного не более чем через 2 часа после забора, количество выделенных клеток жизнеспособностью 95–98% составило $(400\text{--}500) \times 10^3/\text{cm}^2$ из 1 мл жира (рис. 1). При сохранении жировой ткани во флаконе с ЗФР при 4°С и выделении клеточного материала через 18 часов после забора количество клеток уменьшалось на 40–50%, но жизнеспособность оставалась высокой (90–95%). В последующем, «позднелывделенные» клетки не отличались в пролиферативном плане от клеток, полученных в ранние сроки. Многими авторами для выделения клеток из жировой ткани применяется метод ферментативного расщепления с использованием коллагеназы, чаще 1 типа, в различных концентрациях [2,3,4]. В наших исследованиях использовалась коллагеназа 2 типа; показано, что применение 0,1% коллагеназы приводит к полному расщеплению жира в течение 30–45 минут, а снижение концентрации фермента в 2 раза несколько удлиняет время расщепления (до 60–80 минут), что не отражается на количестве и жизнеспособности выделенных клеток.

В настоящее время в качестве источника жировой ткани человека служит аспират подкожного жира переднебрюшной стенки и ягодичной области, редко висцеральный жир,

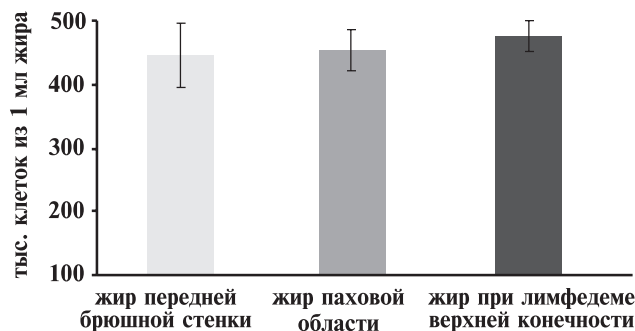
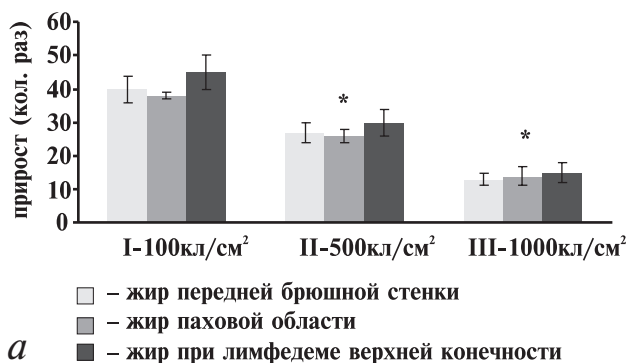


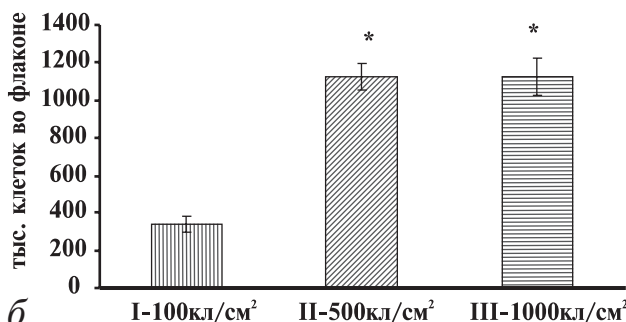
Рис. 2. Количество клеток стромально-васкулярной фракции, выделенных из 1 мл жира из различных источников

полученный при хирургических вмешательствах [5,6]. Мы провели сравнение количества выделенных клеток стромально-васкулярной фракции у относительно здоровых доноров и у женщин с постмастэктомической лимфедемой верхней конечности (рис. 2). Ферментативная обработка проводилась через 1 час после забора жира 0,05% раствором коллагеназы. Время ферментации в трех группах не отличалось и составило около 60 минут. Количество клеток, выделенных в этих группах, находилось в диапазоне $(400-500) \times 10^3/\text{см}^2$ из 1 мл жира, но при лимфедеме было на 9% выше, чем у здоровых людей. Таким образом, жировая ткань при лимфедеме как источник прогенеторных клеток не только не уступает подкожному жиру, но и несколько превосходит по количеству выделенных клеток из равных объемов материала.

Как было показано ранее [9], плотность первичной культуры мононуклеарных клеток костного мозга определяет количество клеток, полученных при 0 пассаже. Показано, что к пластику прикрепляется 1 из 200 мононуклеаров костного мозга, доля прикрепившихся клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани в 10 раз больше [9]. Нами исследована экспансия МСК жира в зависимости от плотности клеток при 0 пассаже (рис. 3). Плотность клеток по сравнению с костным мозгом была уменьшена в 10 раз. Количество фибробластоподобных мезенхимальных клеток, снятых при 0 пассаже возросло в среднем в 40 раз при плотности 100 клеток на 1 см^2 поверхности культурального пластика, в 30 раз — при плотности 500 клеток на 1 см^2 , и в 15 раз — при плотности 1000 клеток на 1 см^2 (рис. 3а). По проценту прироста пролиферации плотность 100 клеток на 1 см^2 в нашем исследовании является преимущественной. Но если сравнивать количество снятых клеток с поверхности всего флакона площадью 75 см^2 , то из флакона при плотности



а



б

* — достоверное отличие ($p < 0,05$) от соответствующего показателя группы I (100 клеток на 1 см^2), # — от показателя группы II (500 клеток на 1 см^2); а — прирост клеточной массы (в количество раз); б — количество выделенных с флакона 75 см^2 клеток.

Рис. 3. Влияние начальной плотности клеток, полученных из различных источников, на экспансию МСК при 0 пассаже

100 клеток/см² выделено $(0,3-0,4) \times 10^6$ клеток, а при плотности 500 и 1000 клеток/см² получено $(1,1-1,2) \times 10^6$ (рис. 3б). Таким образом, при наличии достаточного количества жировой ткани оптимальной концентрацией является 500 клеток/см², что позволяет нарастить достаточное количество МСК.

Ранее было показано, что оптимальной средой для прикрепления и культивирования стромальных клеток костного мозга является среда α -MEM и DMEM с низким содержанием глюкозы [9]. Нами была использована среда DMEM. Стандартная культуральная среда для мезенхимальных клеток содержит FBS. При использовании FBS имеется риск передачи вирусных болезней. Но гораздо большую опасность представляет иммуногенность ксеногенных протеинов FBS. Показано, что однократная обработка 10^8 мезенхимальных клеток костномозгового происхождения в стандартных условиях FBS оставляет до 7–30 мг протеинов в клеточном осадке [11]. Поэтому встает вопрос, может ли аутологичная сыворотка заменить FBS при культивировании МСК жировой ткани. Мы сравнили экспансию клеток при

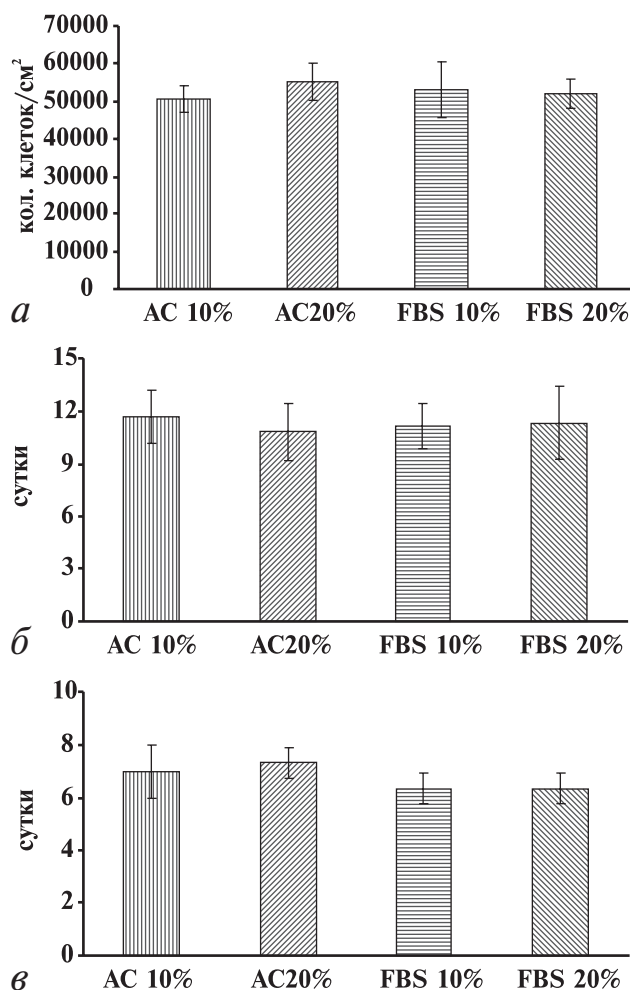


Рис. 4. Сравнительное влияние аутологичной сыворотки и FBS на пролиферацию клеток в культуре

добавлении в культуру аутологичной сыворотки и FBS в двух концентрациях. Как видно на **рисунке 4а**, количество МСК при 0 пассаже существенно не отличается при использовании разных сывороток и составляет $(48-60) \times 10^3/\text{см}^2$, следовательно, FBS не имеет преимуществ перед аутологичной сывороткой. Снижение содержания сыворотки до 5% приводит к значительному уменьшению пролиферации МСК (данные не представлены). Увеличение концентрации сыворотки с 10% до 20% не способствует существенному увеличению пролиферативной активности МСК. Сроки образования субконфлюентного слоя как для FBS, так и для AC составляют 9-11 суток при 0 пассаже (**рис. 4б**), 6-8 суток при 2-3 пассажах (**рис. 4в**). Таким

образом, замена FBS на аутологичную сыворотку не отражается на количестве клеток, полученных при 0 пассаже, и не изменяет сроков образования субконфлюентного слоя. Надо отметить, что при визуальном анализе культур на различных сыворотках до 3 пассажа существенных морфологических различий клеток не наблюдалось. Другими авторами было показано, что FBS не имеет существенных преимуществ при культивировании мезенхимальных клеток костномозгового происхождения [11,12].

Анализируя морфологию стромальных клеток (визуально микроскопически), надо отметить, что на ранних пассажах преобладают мелкие клетки, к 5 пассажу культуры представлены гомогенной популяцией одноклеточных фибробластоподобных веретеновидных клеток, иногда с небольшим количеством отростков. На **рисунке 5** показана культура мезенхимальных клеток жировой ткани после удаления неприлипших клеток через 48 часов после посева (**рис. 5а**), через 7 суток культивирования (**рис. 5б**) и достижения субконфлюентности (**рис. 5в**).

Популяция свежeweделенных клеток жировой ткани гетерогенна и характеризуется высоким содержанием клеток, экспрессирующих антиген стволовых клеток CD34. По мере культивирования наблюдается обогащение популяции клетками, несущими маркеры мезенхимальных клеток [13]. Предварительный анализ клеточных маркеров с помощью проточной цитометрии показал, что свежeweделенные клетки экспрессируют как маркеры гемопоэтических клеток CD34 (до 60%), так и маркеры мезенхимальных клеток CD73 (до 30%), CD90 (до 45%). Дальнейшие исследования направлены на сравнительную фенотипическую и функциональную характеристику популяции клеток жировой ткани здоровых доноров и больных с лимфедемой. Существует тесная взаимосвязь между кровеносной и лимфатической системами — лимфатическая система происходит из венозной, имеются общие факторы роста эндотелия и рецепторы к ним на эндотелиальных клетках. Поэтому интенсивные научные исследования по изучению механизмов, контролирующих рост кровеносных сосудов, привели к идентификации молекул, которые также регулируют развитие и рост лимфатических сосудов. В экспериментальных работах показано, что растворимые белковые ростовые факторы, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF-C и VEGF-D) и рецептор (VEGFR-3), являются критическими в регуляции лимфангиогенеза [14,15]. Во взрослом

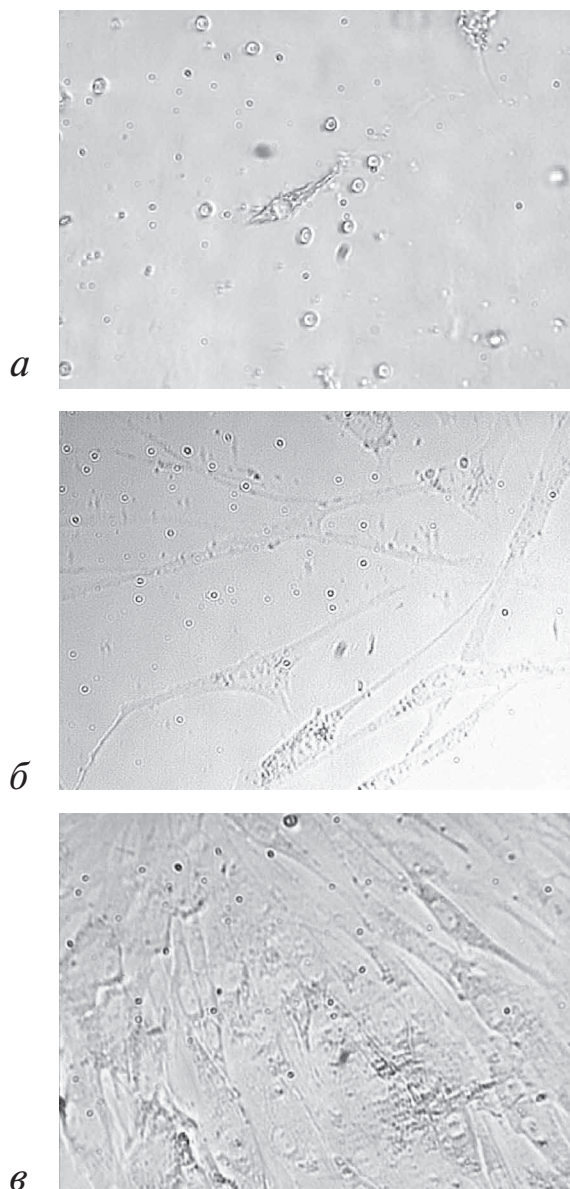


Рис. 5. Культура мезенхимальных клеток жировой ткани: а – через 48 часов после посева; б – через 7 суток культивирования; в – при достижении субконфлюентности.

организме эндотелиальные клетки-предшественники способны мигрировать в ткани и, по аналогии с эмбриональным развитием, способствовать росту как кровеносных сосудов, так и лимфатических. Эндотелиальные клетки-предшественники могут быть выделены из жировой ткани. При введении в организм они могут как дифференцироваться в эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, так и давать рост лимфатическим сосудам.

Выводы

В проведенном исследовании показано, что жировая ткань является доступным источником МСК. Применение 0,05% раствора коллагеназы

способствует выделению $(0,4-0,5) \times 10^6$ клеток из 1 мл жира в ранние сроки и $(0,2-0,3) \times 10^6$ клеток через 18 часов после липоаспирации. Оптимальная плотность клеток составляет $0,5 \times 10^3/\text{см}^2$. Дополнение культуральной среды аутологичной сывороткой в концентрации 10-20% способствует адекватной пролиферации стромально-васкулярной фракции клеток. Клетки жировой ткани, выделенные от больных лимфедемой, не отличаются от клеток здоровых людей ни по количеству, ни по пролиферативному потенциалу. Учитывая экспрессию в свежевыделенных клетках фенотипического маркера гемопоэтических клеток CD34 и секрецию культивируемыми стромальными клетками ангиогенных факторов, жировая ткань может служить источником стволовых клеток для стимуляции ангиогенеза и лимфангиогенеза.

Литература

1. *Giuliana Di Rocco, Maria Grazia Iachininoto, Alessandra Tritarelli et al.* Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells // *Journal of Cell Science* 2006.119:2-945-2952.
2. *V.Planat-Benard, C.Menard, M.Andre et al.* Spontaneous Cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells // *Circ Res* 2004.94:223-229.
3. *Patricia A.Zuk, Min Zhu, Peter Ashjian et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Molecular Biology of the Cell* 2002.13:4279-4295.
4. *Adam J. Katz, Ashok Tholpady, Sunil S. Tholpady et al.* Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal cells // *Stem Cells* 2005.23:412-423.
5. *A.Miranville, C.Heeschen, C.Sengenes et al.* Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells // *Circulation* 2004.110:349-355.
6. *Andrew C.Boguest, Aboulghassem Shahdadfar, Katrine Fronsdal et al.* Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture // *Molecular Biology of the Cell* 2004.16:1131-1141.
7. *Jalees Rehman, Dmitry Traktuev, Jingling Li et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells // *Circulation* 2004.109:1292-1298.
8. *Susanne Kern, Hermann Eichler, Johannes Stoeve et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue // *Stem Cells* 2006.24:1294-1301.
9. *Panagiota A.Sotiropoulou, Sonia A.Peres, Maria Salagianni et al.* Characterization of optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells // *Stem cells* 2006.24:462-471.
10. *James B.Mitchell, Kevin McIntosh, Sanjin Zvonic et al.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers // *Stem Cells* 2006.24:376-385.
11. *Aboulghassem Shahdadfar, Katrine Fronsdal, Terje*

Haug *et al.* In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability // *Stem Cells* 2005.23:1357-1366.

12. Pablo Bosch, Scott L.Pratt, Steven L.Stice. Isolation, characterization, gene modification and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells // *Biology of reproduction* 2006.74:46-57.

13. M. Dominici, K.Le Blanc, I. Mueller *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal

cell. The international society for cellular therapy position statement. // *Cytotherapy* 2006.8:315-317.

14. Yukihiro Saito, Hironori Nakagami, Ryuchi Morishita *et al.* Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. // *Circulation* 2006. 114:1177-1184.

15. Lotta Jussila, Kari Alitalo. Vascular growth factors and lymphangiogenesis// *Physiological Rew* 2002. 82:673-700.

METHODS OF ISOLATION AND CONDITION CULTIVATION STROMAL CELLS OF HUMAN ADIPOSE TISSUE

Olga Vladimirovna POVESHCHENKO, Anatoli Panteleimonovich KOLESNIKOV, Irina Innokentievna KIM, Evgeni Vladimirovich ULIANOV, Antonina Nikolaevna MOZZHERINA, Evgenia Viktorovna YANKAITE, Tatiana Vladimirovna GERTER, Anastasia Olegovna SOLOVIOVA, Elena Vladimirovna ZONOVA, Aleksandr Fedorovich POVESHCHENKO, Vladimir Iosifovich KONENKOV

*SI Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology SB RAMS, Novosibirsk
4, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117*

In present study optimum conditions for allocation and expansion stromal-vascular fraction of cells received from human adipose tissue have been detected. It is shown, that application 0,05 solutions collagenase promotes allocation 0,4-0,5x10⁶ cells from 1 ml of fat in early terms and 0,2-0,3x10⁶ cells in 18 hours after lipoaspiration. The optimum density of cells makes 0,5x10³/cm². Addition autological serum to culture media in concentration 10-20 % facilitate (способствовать) adequate proliferation of stromal-vascular fraction cells. Cells of adipose tissue at lymphedema do not differ from healthy fat neither in quantity of the allocated cells, nor in proliferate potential.

Key word: lipoaspiration, collagenase, stromal cells.

Poveshchenko O.V. — senior research worker, e-mail: poveshchenkoov@mail.ru

Kolesnikov A.P. — senior research worker

Kim I.I. — junior research worker

Ulianov E.V. — post-graduate student

Mozzherina A.N. — post-graduate student

Yankaite E.V. — post-graduate student

Gerter T.V. — post-graduate student

Soloviova A.O. — post-graduate student

Zonova E.V. — Head of therapy department

Poveshchenko A.F. — vice institute director

Konenkov V.I. — Institute director, professor