

# СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

А. Ю. ПЕТРЕНКО, Э. Н. ИВАНОВ, Ю. А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: alexander\_petrenko@cryo.org.ua

Благодаря ряду уникальных свойств и, в частности, способности дифференцироваться в различные типы клеток соединительной ткани, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) привлекают пристальное внимание исследователей. Эти свойства определяют перспективность применения МСК в биотехнологии и регенеративной медицине. В настоящее время большинство работ посвящено изучению свойств МСК, выделенных из костного мозга взрослого человека. В строме жировой ткани также обнаружены популяции стромальных стволовых/прогениторных клеток с мультилинейным потенциалом дифференцировки. В обзоре обобщен опыт экспериментальных работ, посвященных выделению стромальных клеток из жировой ткани и выяснению их биологических свойств. Стромальные клетки жировой ткани обладают схожим с МСК костного мозга иммунофенотипом и способностью к мультилинейной дифференцировке. Вместе с тем описаны некоторые отличия МСК, изолированных из этих источников.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, жировая ткань, иммунофенотип, дифференцировочный потенциал, костный мозг.

Жировая ткань происходит из эмбриональной мезенхимы. У взрослого человека в состав жировой ткани входят жировые клетки — адипоциты, а также клетки, составляющие стромально-васкулярную фракцию (СВФ) жировой ткани: преадипоциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов, периваскулярные фибробласты и поддерживающая волокнистая коллагеновая строма (рис. 1). В строме была обнаружена популяция стволовых/прогениторных клеток с мультилинейным потенциалом дифференцировки, во многом сходных с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), происходящими из костного мозга (КМ). Учитывая, что жировая ткань в значительных количествах (до 300 мл и более) может быть получена под местной анестезией при сравнительно малоболезненной косметической липосакции, липоаспирации подкожного жира или путем эксцизии жировых отложений, эта ткань может явиться альтернативным костному мозгу источником МСК для трансплантации и тканевой инженерии.

## Выделение стромальных клеток из жировой ткани

Zuk et al. [1, 2] впервые установили, что жировая ткань человека является источником мультипотентных стволовых клеток

(СК), причем источником достаточно богатым — из 300 мл жира авторы получали от 10 до  $20 \cdot 10^6$  клеток, названных ими «СК обработанного липоаспирата» (processed lipospirate, PLA). Метод этих авторов, схематически приведенный на рис. 1, заключался в обработке липоаспирата коллагеназой (фрагменты жировой ткани инкубировали при 37 °С в 0,075% -м растворе коллагеназы типа I в течение 30 мин). Центрифугирование первичной суспензии приводило к ее разделению на две фракции. В верхнем светлом слое располагались адипоциты, а в осадке — клетки СВФ с примесью гемопоэтических клеток. Эритроциты удаляли с помощью инкубации в лизирующем растворе хлорида аммония, а другие гемопоэтические клетки, обладающие слабой адгезивной способностью, элиминировались при пассировании.



Рис. 1. Схема выделения стромальных клеток из жировой ткани

Результаты наших исследований [3] показали, что первичная культура адгезивных клеток жировой ткани состоит из морфологически различающихся клеток, что связано с разнообразием исходного спектра клеток в составе СВФ. В ходе монослойного культивирования происходит постепенная очистка культур от слабоадгезивных клеток, и на 5-е сутки культивирования наблюдается равномерный рост клеток по всей поверхности культурального пластика. К 10–12-м суткам культивирования адгезивные клетки СВФ жировой ткани формируют 70–80% конфлюэнтного монослоя. В ходе субкультивирования время достижения указанного состояния монослоя составляет в среднем 3 суток на протяжении 5 пассажей. В процессе субкультивирования гетерогенность исходной суспензии постепенно снижается, и уже после 3–4 пассажей культура СКЖТ представлена популяцией преимущественно фибробластоподобных клеток. В ходе каждого пассажа количество клеток увеличивается в среднем в 2 раза, что согласуется с данными работы [1].

Описанный метод выделения применялся в том же или несколько измененном виде во всех последующих исследованиях СК жировой ткани, но при этом часто изолированные клетки получали новое название: адгезивные клетки стромы из жира человека (human adipose-derived adherent stromal, hADAS) [4]; стромальные клетки, происходящие из жира (adipose-derived stromal cells, ASCs) [5]; происходящие из жировой ткани СК взрослых (adipose derived adult stem cells, ADAS); мезенхимальные стволовые клетки, происходящие из жира (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ATD-MSC) [6, 7], и др. Нам представляется, что термин «стромальные клетки жировой ткани» (СКЖТ), широко используемый как в иностранной, так и русскоязычной литературе [5, 8], вполне точно обозначит объект нашего внимания.

### Иммунофенотип стромальных клеток жировой ткани

Иммунофенотипическая характеристика СКЖТ взрослого человека, полученная различными авторами, приведена в табл. В целом, при анализе экспрессии поверхностных белков было установлено, что СКЖТ, исследованные после субкультивирования клеток СВФ, подобно МСК костного мозга, экспрессируют CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2 и SH3 и не экспрессируют CD31,

CD34 и CD45. Однако при сравнении с МСК КМ, проведенном в работе [1], были выявлены отличия в двух маркерах: СКЖТ экспрессировали CD49d и не содержали CD106, в то время как МСК КМ, наоборот, экспрессировали CD106, но не CD49d. Поскольку CD106 являются лигандами рецепторов, участвующих в хоминге ГСК и их мобилизации из костного мозга [9], отсутствие их опровергает принадлежность СКЖТ к клеткам гемопоэтической линии.

У СКЖТ, полученных от 7 различных доноров, наиболее постоянными поверхностными белками, выявляемыми у 97% клеток, были HLA-ABC, CD29 (интегрин  $\beta$ 1), CD49e (интегрин  $\alpha$ 5/VLA5), CD51 (интегрин  $\alpha$ V) и CD90 (Thy-1). Более вариabильными были белки CD49b (интегрин  $\alpha$ 2/VLA-2), CD49d (интегрин  $\alpha$ 4/VLA-4), CD61 (интегрин  $\beta$ 3), CD138 и CD140a. Остальные из 24 изученных маркеров отсутствовали или выявлялись только у небольшого числа клеток [4].

Относительно экспрессии на СКЖТ общепризнанного маркера ГСК и их ранних потомков CD34 существуют некоторые противоречия. Авторы работ [10, 11] выявили популяцию CD34 в суспензии жировых клеток. Эти данные позволили предположить наличие общего предшественника у клеток с эндотелиальным и адипоцитарным фенотипом [11]. Гистологический анализ жировой ткани, проведенный Трактуевым и др. [8], показал, что CD34-позитивные клетки равномерно распределены в ткани и располагаются между адипоцитами. Однако в исследованиях других лабораторий [12, 13] его экспрессия проявлялась очень слабо или вообще не обнаруживалась. Это может быть обусловлено несколькими причинами: модификациями метода выделения, видом использованных антител, условиями и временем культивирования.

Исследования Cao et al. [12], в которых изучали эндотелиальную дифференцировку СКЖТ *in vitro* и *in vivo*, подтвердили наличие в этих клетках CD29, CD44, CD105, CD166 и Flk1 (один из рецепторов VEGF, являющийся самым ранним дифференцировочным маркером эндотелия и клеток крови), но не кроветворных или эндотелиальных маркеров (CD31, CD34, CD45, CD106 и CD184). При культивировании в среде, содержащей VEGF и bFGF, СКЖТ приобретали морфологию эндотелиальных клеток, экспрессировали CD34, PECAM, VE-кадгерин, eNOS и способствовали неоваскуляризации иммунодефицитных мышей при трансплантации, сохраняя при этом экспрессию CD34

## Характеристика субкультивированных СКЖТ человека

Автор	Фенотип	Дифференцировка	Факторы, индуцирующие дифференцировку
Gronthos et al. [10]	<p><u>Позитивны по:</u> HLA-ABC, CD9, CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD59, CD105, CD49e, CD54, CD55, CD166</p> <p><u>Негативны по:</u> HLA-DR, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD18, CD31, CD45, CD50, CD56</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная	<p><u>Остеогенные:</u> витамин D<sub>3</sub>, дексаметазон</p> <p><u>Адипогенные:</u> инсулин, дексаметазон, 1-метил-3-изобутилксантин, BRL49653</p>
Zuk et al. [1, 2]	<p><u>Позитивны по:</u> CD13, CD29, CD44, CD49d, CD71, CD90, CD105, SH3, STRO-1</p> <p><u>Негативны по:</u> CD31, CD34, CD45, CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104, CD106</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная, хондрогенная, миогенная, нейрогенная	<p><u>Остеогенные:</u> витамин D<sub>3</sub>, аскорбат, β-глицерофосфат</p> <p><u>Хондрогенные:</u> инсулин, TGF-β1, аскорбат</p> <p><u>Миогенные:</u> сыворотка КРС и человека, гидрокортизон</p> <p><u>Нейрогенные:</u> β-меркаптоэтанол</p>
Planat-Benard et al. [11]	<p><u>Позитивны по:</u> CD34, CD13</p> <p><u>Негативны по:</u> CD31, CD14, CD144, CD45</p>	<i>In vitro</i> и <i>in vivo:</i> эндотелиальная	Спонтанно в метилцеллюлозной среде (Methocult MG3534)
Brzoska et al. [14]	<p><u>Позитивны по:</u> CD10, CD13, CD44, CD90 виментин</p> <p><u>Негативны по:</u> CD31, CD34, CD45, vWF</p>	<i>In vitro:</i> эпителиальная	Ретиноевая кислота
Петренко и др. [3]	<p><u>Позитивны по:</u> CD29, CD44, CD73, CD105</p> <p><u>Негативны по:</u> CD34, CD38, CD45</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная	<p><u>Остеогенные:</u> аскорбат, β-глицерофосфат, дексаметазон, сыворотка</p> <p><u>Адипогенные:</u> гидрокортизон, 1-метил-3-изобутилксантин, индометацин</p>
Cao et al. [12]	<p><u>Позитивны по:</u> CD29, CD44, CD105, CD166, Flk1, HLA-ABC</p> <p><u>Негативны по:</u> CD31, CD34, CD45, CD106, CD184</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная, <i>in vitro</i> и <i>in vivo:</i> эндотелиальная	<p><u>Остеогенные:</u> аскорбат, β-глицерофосфат, дексаметазон, сыворотка</p> <p><u>Адипогенные:</u> гидрокортизон, 1-метил-3-изобутилксантин, индометацин</p> <p><u>Эндотелиальные:</u> VEGF, b-FGF, ЭСТ</p>
Astori et al. [7]	<p><u>Позитивны по:</u> CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166</p> <p><u>Негативны по:</u> CD34, CD38, CD45, CD133, CD31, CD271</p>	<i>In vitro:</i> остеогенная, адипогенная, хондрогенная	<p><u>Остеогенные:</u> аскорбат, β-глицерофосфат, дексаметазон</p> <p><u>Адипогенные:</u> инсулин, дексаметазон, 1-метил-3-изобутилксантин, индометацин</p> <p><u>Хондрогенные:</u> TGF-β3, аскорбат, дексаметазон, пируват</p>

человека. Эти результаты позволили авторам прийти к заключению, что полученные *in vitro* эндотелиальные клетки с описанными свойствами, которым присуща экспрессия CD34, происходят из СКЖТ, а не из эндотелиальных клеток, содержащихся в исходном клеточном препарате.

Однако проведенный недавно анализ иммунофенотипа клеток СВФ и его изменение в ходе субкультивирования [7,15] позволяют усомниться в правильности выводов Cao et al. [12]. Эти исследования показали, что в первичной суспензии присутствуют клетки, экспрессирующие, главным образом, маркеры эндотелиальных (CD31, CD144, VEGFFr-2, фактор Виллебранта), стромальных (CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD166) и кровяных (CD34, CD45, CD11, CD13, CD14) клеток. При культивировании в «стромальной» среде в течение по крайней мере четырех пассажей экспрессия эндотелиальных маркеров сохраняется на уровне первичной суспензии. Следовательно, последующее культивирование в среде с VEGF [12] может способствовать селективному размножению клеток эндотелиального фенотипа.

Определенные успехи были достигнуты и в выяснении природы клеток, экспрессирующих CD34-антиген. В первичной суспензии клеток СВФ были выявлены две популяции CD34-позитивных клеток, причем претенденты на гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>) составляли лишь около 2% клеток [7]. Для более полного понимания источника гемопоэтических клеток в жировой ткани авторы исследовали колониобразующую активность CD34<sup>+</sup>-клеток, изолированных с помощью магнитной сепарации. Было установлено, что содержание кровяных колониобразующих единиц (КОЕ) в свежесыведенных клетках СВФ сравнимо с периферической кровью. Эти результаты позволяют предполагать, что гемопоэтические CD34<sup>+</sup>-клетки попадают в жировую ткань из циркулирующей крови. При субкультивировании в «стромальной» среде количество клеток, экспрессирующих CD34-антиген, снижается до порога чувствительности метода или вообще исчезает.

Маркеры, ассоциированные со стромальными клетками (CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD105), были слабо экспрессированы на свежесыведенных клетках СВФ жира и увеличивались от пассажа к пассажи, превышая 90% на пассаже 4 (P4) (рис. 2). При изучении представленности свыше 170

генов в СКЖТ, полученных от трех доноров, установили, что 66% этих генов были транскрибированы во всех клетках, а 83% — обнаруживались по крайней мере в двух из трех популяций. Наиболее часто транскрибированные гены: эндоглин, FGF 2, 6 и 7, FGF R3, нейропиплин-1, остеоонектин, фибронектин, VEGF-D, TNF-а и MMP2 (желатиназа А) были связаны с адгезией клеток, белками матрикса, ростовыми факторами и рецепторами протеаз. Эти данные указывают на сходство генного профиля СКЖТ и МСК из стромы КМ. В то же время СКЖТ не экспрессировали ряд белков, которые считаются молекулярными маркерами ранних СК, такие как CD133, мембранный транспортер ABCG2 и теломераза [4].

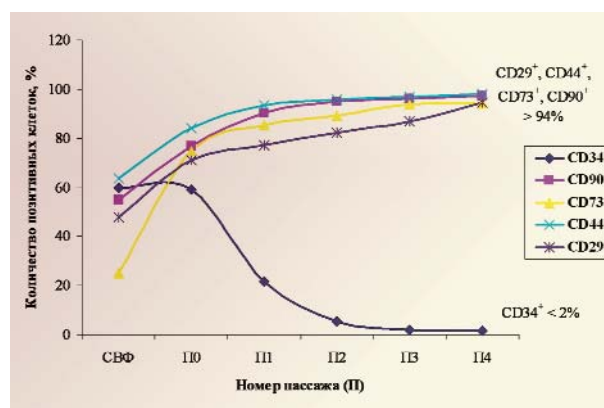


Рис. 2. Изменение иммунофенотипа СКЖТ в ходе субкультивирования (по данным Mitchel et al. [15])

### Дифференцировочный потенциал стромальных клеток жировой ткани

#### Дифференцировка СКЖТ в мезодермальные линии

СКЖТ способны к индуцированной дифференцировке *in vitro* в адипогенном, остеогенном, хондрогенном, эндотелиальном, миогенном, гепатическом, эпителиальном и нейрогенном направлениях. Поскольку до настоящего времени не существует надежных методов определения *in vitro* функциональных свойств хондроцитов, остеоцитов и миоцитов, дифференцировка СКЖТ в адипогенном направлении имеет явное преимущество для изучения биологии развития соединительной ткани, так как адипоциты обладают двумя уникальными свойствами:

1) запасают энергию в форме триглицеридов, которые освобождаются при липолизе в виде глицерола и свободных жирных кислот;



2) секретируют в кровь специфические для жира белки, в частности лептин и адипонектин.

Адипогенная дифференцировка СКЖТ обычно индуцируется внесением в среду изобутилметилксантина, дексаметазона, инсулина или индометацина. Ее эффективность оценивается в культуре на основании появления клеток округлой формы, содержащих внутриклеточные липидные капли, которые окрашиваются красителем масляным красным О (Oil Red O). Кроме того, адипогенная индукция СКЖТ приводит к значительному увеличению активности глицеролфосфатдегидрогеназы — фермента, участвующего в синтезе триглицеридов, а также в экспрессии ряда генов и/или белков, вовлекаемых в биосинтез и хранение липидов, в частности, PPAR  $\gamma$ 2 (жироспецифический фактор транскрипции, функционирующий в преадипоцитах), липопротеиновая липаза (фермент, высвобождающий жирные кислоты из липопротеидов крови, активизирующийся во время липогенеза), аР2-белок (связан с накоплением липидов внутри зрелых адипоцитов), мРНК лептина и GLUT4 [1].

Dicker et al. [16] изучали функциональные свойства адипоцитов человека, полученных путем дифференцировки СКЖТ и МСК, выделенных из КМ. Оба типа клеток проявляли сходную липолитическую способность при стимуляции катехоламинами, включая выраженный антилиполитический эффект, опосредованный через  $\alpha$ 2-адренорецепторы. Оба типа клеток с одинаковой скоростью секретировали специфические факторы жировых клеток — лептин и адипонектин и сохраняли способность к дифференцировке в течение, по крайней мере, 15 пассажей.

Остеогенную дифференцировку индуцируют при помещении СКЖТ в среду, содержащую аскорбат,  $\beta$ -глицерофосфат, дексаметазон или витамин D<sub>3</sub>. Через 2–4 недели культивирования дифференцировку оценивают по появлению активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и кальцификации матрикса, которую визуализируют окрашиванием ализариновым красным и по Ван Коссу. Индукция клеток СКЖТ в «остеогенной» среде, содержащей витамин D<sub>3</sub>, приводит к развитию процессов, свидетельствующих об остеогенезе: раннему повышению активности ЩФ и минерализации матрикса; экспрессии большинства генов, подтверждающих остеогенную дифференцировку, а именно *c-fos* и *msx2* — генов, участвующих в диффе-

ренцировке остеобластов; RXR-ретиноидных рецепторов; VDR — рецепторов витамина D; PTHrP — рецепторов паратгормона; остеопонтина; остеоонектина; CBFA-1 — фактора транскрипции, связывающего с промоторами ряд остеогенных генов, и коллагена типа I [1]. Авторы наблюдали также раннюю экспрессию остеокальцина, подавляемую экспозицией с дексаметазоном. При исследовании СКЖТ была подтверждена чрезвычайно важная роль костного морфогенетического белка 2 (КМБ-2) в качестве остеоиндуктивного фактора. Клетки СКЖТ, инфицированные аденовирусом, несущим сДНК КМБ-2, были способны сами образовывать КМБ-2.

Хондрогенная дифференцировка СКЖТ в средах, содержащих TGF- $\beta$ 1, инсулин и аскорбат, характеризуется образованием плотных узелков, проявляющих типичные черты клеток, развивающихся в направлении хондрогенеза, а именно: накопление сульфатированных протеогликанов и появление изоформы коллагена типа II и богатых лейцином небольших протеогликанов декорина и бигликана; поздняя экспрессия коллагена типа X — маркера гипертрофических хондроцитов; экспрессия ряда факторов транскрипции, таких как *myf6*, *myf5*, *myod1*, миогенин, и структурных белков десмина и миозина [1]. Erickson et al. [17] продемонстрировали, что СКЖТ человека могут образовывать у иммунодефицитных мышей характерные молекулы хрящевого матрикса. Lin et al. [5], пометив СКЖТ зеленым флуоресцирующим белком (GFP), доказали, что они могут быть индуцированы к хондрогенезу *in vitro*. Методами иммуноцитохимии, PCR-RT и Western blot в меченых дифференцированных клетках были выявлены такие важные компоненты хрящевой ткани, как SOX9, коллаген типа I, коллаген типа II, агрекан и коллаген типа X. При длительном культивировании в монослое хондрогенные линии СКЖТ подвергались, подобно нормальным хондроцитам, фенотипической модуляции, определяемой как дедифференцировка.

Исследования хондрогенной дифференцировки СКЖТ *in vitro* и *in vivo* предполагают перспективность их использования для восстановления дефектов хряща. Вследствие слабой регенеративной способности хондроцитов поражения хрящевой ткани не поддаются спонтанному восстановлению и заживлению. В этих случаях трансплантация аутологичных СК или созданной на их основе биоинженерной конструкции может компенсировать дефект хрящевой ткани.

В настоящее время как исходный материал для биоинженерии хряща используются клеточные популяции надкостницы или КМ, содержащие СК, которые могут быть индуцированы к хондрогенезу. Однако получение СК из этих источников не обеспечивает большого выхода клеток, а методы их выделения трудоемки и болезненны для пациентов. Напротив, хондрогенная индукция СКЖТ в среде, содержащей трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ 1), обеспечивает высокий темп пролиферации хондроцитов и синтез внеклеточного матрикса. Короткое время жизни ростовых факторов может быть препятствием для пролиферации хондроцитов *in vivo*. К тому же прямое введение TGF- $\beta$ 1 в организм пациента небезопасно из-за возможности развития воспаления, образования остеофибов, фиброза и эрозии хряща. Можно предположить, что сохранение необходимой концентрации TGF- $\beta$ 1 будет обеспечено применением СКЖТ, генетически модифицированных к образованию необходимой концентрации TGF- $\beta$ 1. С другой стороны, более реальным для практической медицины подходом является направленная индукция хондрогенной дифференцировки СКЖТ в культуре с последующей трансплантацией в зону повреждения. Однако прежде всего необходимо ответить на вопрос: могут ли клетки, полученные из жировой ткани, выполнять функцию хряща *in vivo*.

Nathan et al. [6] на основании биомеханических и морфологических исследований показали, что в регенерации остеохондральных дефектов мышечка бедра кролика СКЖТ проявили себя лучше, чем МСК, выделенные из надкостницы. Сравнительное изучение способности СК, выделенных из КМ, надкостницы и жировой ткани, корректировать частичную задержку роста кости у кроликов было проведено в работе James et al. [18]. Авторы отмечают, что все исследованные клеточные препараты демонстрировали хондрогенный и остеогенный потенциал дифференцировки *in vitro*. Вместе с тем, в системе *in vivo* лучшую коррекцию роста кости обеспечивали препараты из КМ и надкостницы. Исследователи из Кореи, сравнившие потенциал остеогенеза и хондрогенеза у СКЖТ и МСК КМ, также отдали предпочтение последним [19].

Для эндотелиальной дифференцировки *in vitro* СКЖТ вносили в лунки планшета с матриксом в среду, содержащую VEGF, b-FGF и сыворотку [12]. Эндотелиальный фенотип устанавливали по экспрессии эндотелиальных маркеров, включающих CD31

(PECAM), CD34, CD144 (VE-кадгерин) и NO-синтазы эндотелиальных клеток (eNOS). Авторы показали, что при культивировании в этих условиях СКЖТ экспрессировали эндотелиальные маркеры. При этом ингибитор киназы PI3 LY294002 блокировал дифференцировку в эндотелиальном направлении. *In vivo* СКЖТ дифференцировались в эндотелиальные клетки под влиянием местных сигналов и способствовали неангиогенезу у мышей с ишемией задних конечностей. Эти результаты свидетельствуют о том, что СКЖТ могут быть потенциальным источником эндотелиальных клеток для проведения клеточной противостенокардиальной терапии.

Способность СКЖТ дифференцироваться в миогенном направлении была установлена в пионерских работах Zuk et al. [1, 2] по выделению этих клеток. В качестве индукторов миогенной дифференцировки авторы использовали гидрокортизон в сочетании с сывороткой (табл. 1). В работах [20, 21] выявлена спонтанная дифференцировка первичной суспензии клеток СВФ в миогенном направлении. Причем, миогенная дифференцировка увеличивалась при культивировании в присутствии миобластов как в условиях, исключающих контакт клеток, так и при их совместном культивировании [21]. После сокультивирования и трансплантации в ишемически поврежденные мышцы иммунодефицитных мышей клетки СВФ встраивались в мышечные волокна и экспрессировали дистрофин.

После культивирования в течение 6 недель (3 пассажа) в специфичной для гладких мышц среде в присутствии гепарина клетки СВФ экспрессировали миогенные маркеры –  $\alpha$ -актин (ASMA), кальпонин, кальдесмон, SM22, тяжелую цепь миозина (myosin heavy chain, MHC) и смустелин [22]. Следует подчеркнуть, что наличие вышеперечисленных маркеров было подтверждено параллельно генетическими и иммунофенотипическими методами. Более того, авторам удалось показать функцию дифференцированных мышечных клеток: их последовательное сокращение под действием стимулятора холинэргических рецепторов карбохола и последующую релаксацию добавкой конкурентного антагониста мускариновых холинэргических рецепторов атропина. Причем на фармацевтические препараты (карбохол и атропин) отвечали только окончательно дифференцированные в миогенном направлении клетки, но не их коммитированные предшественники.

Чрезвычайно важным на наш взгляд результатом этой работы явилась попытка авторов выяснить вопрос: является ли развитие мышечных клеток результатом селекции определенного типа клеток СВФ или дифференцировки СКЖТ? Для решения этого вопроса был проведен клональный анализ первичной суспензии СВФ. Конечным итогом работы было выделение и тестирование колоний, клетки которых были способны дифференцироваться как в адипогенном и остеогенном, так и в миогенном направлениях.

#### **Дифференцировка СКЖТ в эктодермальных направлениях**

В связи с тем, что жировая ткань, подобно строме КМ, является производным мезодермы, дифференцировка СКЖТ в мезодермальные линии вполне закономерна, однако выявлена также возможность дифференцировки этих клеток в эктодермальные линии, в частности в эпителиальные и нейрогенные клетки. Brzoska et al. [14] показали, что все трансретиневые кислоты могут индуцировать СКЖТ к экспрессии цитокератина 18 — маркера эпителиальных клеток.

Нейрогенную дифференцировку обычно устанавливают на основании появления клеток характерной морфологии, положительно окрашивающихся на  $\beta$ -тубулин нейроволокон. Zuk et al. [1] оценивали нейрогенную дифференцировку СКЖТ по экспрессии нестина — белка промежуточных филаментов, представленного на высоком уровне в НСК. Учитывая, что позитивное мечение нестином проявляют также миогенные, эндотелиальные и печеночные клетки, авторы работы [1] подтверждали нейрональную дифференцировку СКЖТ экспрессией двух специфических для нейральных клеток белков: NSE (нейронспецифическая энолаза) и NeuN (нейрональный белок ядер). Safford et al. [23] также сообщили, что СКЖТ мыши в определенных условиях способны дифференцироваться по нейрогенному пути с образованием типичных нейрональных и глиальных клеток. Романов и др. [20], заменившие сыворотку телят в среде культивирования СКЖТ на сыворотку пуповинной крови человека, наблюдали появление в клетках спонтанной (без предшествующей нейрональной индукции) экспрессии  $\beta$ -тубулина.

#### **Дифференцировка СКЖТ в гепатоциты**

Недавно появились результаты, свидетельствующие о возможности СКЖТ дифференцироваться в гепатоциты — производ-

ные эндодермального зародышевого листка [24]. Авторы провели двухэтапную гепатическую дифференцировку СКЖТ после предварительного культивирования в безсывороточной среде. На первом этапе клетки 7 дней культивировали в присутствии HGF, bFGF и никотинамида, а на втором — в среду внесили онкостатин М, дексаметазон, инсулин, трансферин, селен и альбумин. В ходе культивирования клетки изменяли фибробластоподобную морфологию на полигональную, что сопровождалось снижением экспрессии маркера стволовых клеток Thy-1. В течение 21 дня культивирования СКЖТ вырабатывали специфические для печени транскрипционные факторы (C/EBP $\beta$  и HNF4 $\alpha$ ) и экспрессировали маркеры гепатоцитов (альбумин и цитохром P-450).

#### **Сравнение стромальных клеток жировой ткани и костного мозга**

Решающим подтверждением наличия в жировой ткани стволовых клеток явилось получение из единичных СКЖТ клонов, обладающих мультилинейным потенциалом дифференцировки [1]. Многие исследователи отмечают большое сходство популяций СКЖТ и МСК КМ. В связи с этим был даже поставлен вопрос, не являются ли СКЖТ популяцией МСК, которая попадает в жировую ткань из периферической крови. Однако такое предположение кажется сомнительным, поскольку число МСК в строме КМ незначительно (примерно 1 МСК на  $10^5$  клеток) [24, 25] и, очевидно, еще ниже в периферической крови. Вряд ли такой низкий уровень может обеспечить относительно высокие уровни дифференцировки, наблюдаемые в работе со СКЖТ. В то же время исследование [7, 26] показали, что содержание МСК во фракции адгезивных клеток, извлеченных из жировой ткани, в 10–1000 раз выше, чем в соответствующей фракции КМ. Помимо этого существуют некоторые отличия популяций СКЖТ и МСК: во-первых, при культивировании МСК необходим скрининг сыворотки, тогда как для экспансии и дифференциации СКЖТ он не обязателен; во-вторых, МСК не подвергались хондрогенной или липогенной дифференцировке в тех условиях, которые были выдержаны в работе со СКЖТ [1].

В последнее время появились работы, в которых проведены прямые сравнительные исследования свойств МСК, изолированных из жировой ткани и костного мозга. Noel et al. [27] в системах *in vitro* и *in vivo*



показали, что СКЖТ и МСК КМ проявляют одинаковую способность к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлениях. Эти результаты не полностью согласуются с работами [28,29]. Так, Vochev et al. [28], исследуя СКЖТ и МСК КМ в одинаковых условиях *in vitro*, установили, что они демонстрируют практически идентичные морфологические, иммунофенотипические, колониеобразующие свойства и способность к дифференцировке в адипогенном направлении. Однако СКЖТ проявляли меньший потенциал к дифференцировке в остеогенном направлении, чем МСК КМ [28]. Сходные данные о меньшем остеогенном потенциале СКЖТ были получены и в работе [29]. При этом остеогенный потенциал стромальных клеток костного мозга стимулировался мелатонином, а жировой ткани — подавлялся.

Обсуждая перспективу клинического применения СКЖТ, целесообразно привести результаты исследования [28], в котором установлено, что СКЖТ в значительно большей степени, чем МСК КМ, проявляют иммуномодулирующий эффект (ингибируют продукцию иммуноглобулинов и подавляют функцию В-лимфоцитов). Приведенные данные по сравнительному изучению стромальных клеток жировой ткани и костного мозга показывают, что СКЖТ можно рассматривать в качестве полноценной альтернативы МСК КМ для клинического применения. Это заключение подтверждается

клиническими наблюдениями. В частности, СКЖТ были успешно применены для лечения ректовагинальной фистулы у пациентки с болезнью Крона [30].

Следует отметить, что роль СКЖТ в организме не полностью ясна. Не известно, находятся ли они в дормантном состоянии с самых ранних стадий дифференцировки или пролиферируют в замедленном ритме, замедляя дегенерирующие или с нарушенной функцией клетки.

Таким образом, изначально гетерогенная стромально-васкулярная фракция жировой ткани содержит популяцию стромальных клеток, характеризующихся высокими адгезивными свойствами, фенотипом, характерным для МСК, и способностью к мультилинейной дифференцировке. Относительная простота и низкая травматичность процедуры получения жировой ткани, возможность выделения из нее значительного количества стволовых/прогениторных клеток, способных к селективному размножению в недифференцированном состоянии с последующей дифференцировкой в клетки различных тканей, позволяют рассматривать СКЖТ в качестве перспективного объекта для аутологических трансплантаций.

*Работа выполнена в рамках программы «Новітні медико-біологічні проблеми та навколишнє середовище людини».*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell.* — 2002. — V. 13. — P. 4279–4295.
2. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* — 2001. — V. 7. — P. 211–218.
3. Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Скоробогатова Н. Г. и др. Стромальные клетки-предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании // *Журн. АМН України.* — 2008. — Т. 14, №2. — С. 354–365.
4. Katz A. J., Tholpady A., Tholpady S. S. et al. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal cells // *Stem cells.* — 2005. — V. 23. — P. 412–423.
5. Lin Y., Tian W., Chen X. et al. Expression of exogenous or endogenous green fluorescent protein in adipose tissue-derived stromal cells during chondrogenic differentiation // *Mol. Cell Biochem.* — 2005. — V. 277. — P. 181–190.
6. Nathan S., Das De S., Thambyah A. et al. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue // *Tissue Eng.* — 2003. — V. 9. — P. 733–744.
7. Astori G., Vignati F., Bardelli S. et al. «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. Transpl. Med.* — 2007. — V. 5, N1. — P. 55.
8. Трактюев Д. О., Парфенова Е. В., Ткачук В. А., Марч К. Л. Стромальные клетки жировой ткани — пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом // *Цитология.* — 2006. — Т. 48, № 2. — С. 83–93.
9. Kronenwentt R., Martin S., Haas R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells // *Stem Cells.* — 2000. — V. 18. — P. 320–330.



10. *Gronthos S., Franklin D. M., Leddy H. A. et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells // *J. Cell. Physiol.* — 2001. — V. 189. — P. 54–63.
11. *Planat-Benard V., Silvestre J. S., Cousin B. et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives // *Circulation.* — 2004. — V. 109. — P. 656–663.
12. *Cao Y., Sun Z., Liao L. et al.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — V. 332. — P. 370–379.
13. *Fraser J.K., Wulur I., Alfonso Z., Hedrick M.H.* Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology // *Trends in Biotechnology.* — 2006. — V. 24, N4. — P. 150–154.
14. *Brzoska M., Geiger H., Gauer S. et al.* Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — V. 330. — P. 142–150.
15. *Mitchel J.B., McIntoch K., Zvonic S. et al.* Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers // *Stem Cells.* — 2006. — V. 24. — P. 376–385.
16. *Dicker A., Le Blanc K., Gaby A. et al.* Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue // *Exp. Cell Research.* — 2005. — V. 308. — P. 283–290.
17. *Erickson G.R., Gimble J.M., Franklin D.M. et al.* Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2002. — V. 290. — P. 763–769.
18. *James H.P., Li Li, Yee-Hong T. et al.* Comparative Study of the Ability of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Periosteum, and Adipose Tissue in Treatment of Partial Growth Arrest in Rabbit // *Tissue Eng.* — 2005. — V. 11, N5/6. — P. 904–912.
19. *Gun I., Shin Y. W., Lee K. B.* Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells // *Osteoarthritis and Cartilage.* — 2005. — V. 13. — P. 845–853.
20. *Романов Ю.А., Даревская А.Н., Кабаева Н.В., Антонова О.А.* Выбор оптимальных условий культивирования мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга и жировой ткани человека // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* — 2006. — Т. 4. — С. 206–211.
21. *Di Rocco G., Iachininoto M.G., Tritarelli A. et al.* Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells // *J. Cell Sci.* — 2006. — V. 119, N14. — P. 2945–2952.
22. *Rodri'guez L.V., Alfonso Z., Zhang R. et al.* Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells // *PNAS.* — 2006. — V. 103, N32. — P. 12167–12172.
23. *Safford K. M., Safford S. D., Gimble J. M. et al.* Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells // *Exp. Neurol.* — 2004. — V. 187. — P. 319–328.
24. *Talens-Visconti R., Bonora A., Jover R. et al.* Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells // *World J. Gastroenterol.* — 2006. — V. 12, N36. — P. 5834–5845.
25. *Bruder S. P., Jaiswal N., Ricalton N. S. et al.* Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration // *Clin. Orthop. Rel. Res.* — 1998. — V. 355. — P. 247–256.
26. *Mosley T.A., Zhu M., Hedrick M.H.* Adipose-Derived Stem and Progenitor Cells as Fillers in Plastic and Reconstructive Surgery // *Plast. Reconstr. Surg.* — 2006. — V. 118, N3. — P. 121–128.
27. *Noel D., Caton D., Roche S. et al.* Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials // *Exp. Cell Res.* — 2008. — V. 314, N7. — P. 1575–1584.
28. *Bochev I., Elmadjian G., Kyurkchiev D. et al.* Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro // *Cell Biol. Int.* — 2008. — V. 32, N4. — P. 384–393.
29. *Zaminy A., Ragerdi Kashani I., Barbarestani M. et al.* Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor // *Iran Biomed. J.* — 2008. — V. 12, N3. — P. 133–141.
30. *Garcia-Olmo D., Garcia-Arranz M., Garcia L. G., et al.* Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy // *Int. J. Colorectal Dis.* — 2003. — V. 18. — P. 451–454.

## СТОББУРОВІ КЛІТИНИ ІЗ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

*О. Ю. Петренко, Е. М. Іванов,  
Ю. О. Петренко*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини  
НАН України, Харків

*E-mail: payua@yahoo.com*

Завдяки низці унікальних властивостей і, зокрема, здатності диференціюватися у різні типи клітин сполучної тканини мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) привертають пильну увагу дослідників. Ці властивості визначають перспективність застосування МСК у біотехнології і регенеративній медицині. На цей час більшість робіт присвячено вивченню властивостей МСК, виділених із кісткового мозку дорослої людини. У стромі жирової тканини також виявлено популяцію стромальних стовбурових/прогеніторних клітин з мультилінійним потенціалом диференціювання. В огляді узагальнено досвід експериментальних робіт, присвячених виділенню стромальних клітин із жирової тканини і з'ясуванню їхніх біологічних властивостей. Стромальні клітини жирової тканини мають подібні до МСК кісткового мозку імунофенотип і здатність до мультилінійного диференціювання. Разом з тим описано деякі відмінності МСК, ізольованих із цих джерел.

**Ключові слова:** стовбурові клітини, жирова тканина, імунофенотип, диференціальний потенціал, кістковий мозок.

## STEM CELLS OF ADIPOSE TISSUE

*O. Yu. Petrenko, E. M. Ivanov,  
Yu. O. Petrenko*

Institute for problems of cryobiology  
and cryomedicine of National Academy  
of Sciences of Ukraine, Kharkiv

*E-mail: payua@yahoo.com*

Due to ability to differentiation into different cells of connective tissue mesenchymal stem cells (MSC) are promising object for biotechnology and regenerative medicine. The most studies on human MSC have been carried out on cells isolated from adult bone marrow. In stromal fraction of adipose tissue the cell population with multilineage differentiation potential has been revealed. The aim of the review is to describe the current state of isolation method and properties of MSC from adipose tissue. Stromal cells from adipose tissue possess of similar to bone marrow derived MSC immunophenotype and capacity to multilineage differentiation. At once some peculiar properties of MSC isolated from these sources are discussed.

**Key words:** stem cells, adipose tissue, immunophenotype, differentiation potential, bone marrow.