

Выделение, культивирование и дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани крыс *Rattus norvegicus* и хомяков *Mesocricetus auratus*

М.Н. Катина¹, Р.Ф. Гайфуллина¹, З.Г. Хаятова², Ч.Ч. Эмене¹, А.А. Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

² Казанский государственный медицинский университет, Казань

Isolation, culture and differentiation of rat (*Rattus norvegicus*) and hamster (*Mesocricetus auratus*) adipose derived multipotent mesenchymal stromal cells

M.N. Katina¹, R.F. Gaifullina¹, Z.G. Hayatova², Ch.Ch. Emene¹, A.A. Rizvanov¹

¹ Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan

² Kazan State Medical University, Kazan

Клеточная терапия различных заболеваний представляется в последние годы все более перспективным направлением в медицине. Для терапевтических целей возможно получать аутогенные стволовые клетки из жировой ткани. Для доклинических исследований клеточной терапии заболеваний требуются модели заболеваний на животных, однако чаще всего применяемые крысы и мыши не способны к развитию целого ряда актуальных заболеваний, которые могут быть смоделированы на сирийских хомяках. При анализе литературных данных не было обнаружено каких-либо сведений о получении и исследовании свойств стволовых клеток хомяков, что важно для разработки методов клеточной терапии с применением моделей заболеваний у этих животных. В данном исследовании впервые получены стволовые клетки из жировой ткани сирийских хомяков, описана их морфология, свойства и потенциал дифференцировки в различных направлениях. Показано, что эти клетки аналогичны мультипотентным мезенхимным стромальным клеткам по их способности к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлении. Также показана способность клеток дифференцироваться в нейрогенном направлении.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, мультипотентная дифференцировка, адипогенез, остеогенез, нейрогенез, сирийские хомяки.

Клеточная терапия различных заболеваний представляется в последние годы все более перспективным направлением в медицине и биотехнологии. Стволовые и прогениторные клетки для терапевтических целей могут быть выделены из различных органов и тканей. Так, они обнаружены в кроветворном костном мозге, эпидермисе, нервной, мышечной, костной и жировой ткани, в небольших количествах содержатся и в периферической крови. В клинической практике для получения аутогенных стволовых клеток возможно использование аспириатов из жировой ткани и костного мозга. Благодаря тому, что процедуры изъятия ткани при этом малотравматичны и не ведут к образованию косметического или функционального дефекта, возможно одномоментное взятие довольно большого объема образца, что позволяет в более короткие сроки получить необходимое количество клеток [1]. Жировая ткань состоит в основном из зрелых адипоцитов — клеток, мало-

способных к пролиферации. Прогениторные клетки, за счет которых происходит обновление жировой ткани, содержатся в периваскулярной зоне мелких сосудов и составляют так называемую стромально-васкулярную фракцию. Эти клетки довольно гетерогенны, представлены перидитами, фибробластами, преадипоцитами, а также мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК), способными дифференцироваться в адипогенном, остеогенном, хондрогенном, миогенном и фиброгенном направлениях [2]. Дифференцировочный потенциал их в некоторой степени схож с так называемыми мезенхимными стволовыми клетками — клетками мезенхимы эмбриона, способными дифференцироваться в различные клетки соединительной ткани и кроветворные клетки. Однако ММСК жировой ткани являются клетками взрослого организма и не способны к дифференцировке в кроветворном направлении [3]. Считается, что ММСК являются наиболее

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, multipotent differentiation, adipogenesis, osteogenesis, neurogenesis, Syrian hamsters.

e-mail: rizvanov@gmail.com

удобным и безопасным материалом для клеточной терапии и тканевой инженерии.

Прежде чем новый препарат или метод лечения войдет в широкую клиническую практику, он должен пройти целый ряд доклинических (*in vitro* и *in vivo*) и клинических исследований. Крысы и мыши — одни из самых «популярных» лабораторных животных, позволяющих моделировать ряд заболеваний и патологических состояний человека. Другие грызуны, как, например, сирийские хомяки также применяются в доклинических исследованиях. Их частое использование обусловлено простотой содержания, быстрым размножением и развитием, а также рядом анатомических и физиологических особенностей организма. Такие особенности их иммунной системы, как высокая чувствительность к вирусному онкогенезу [4], наличие иммунопrivилегированных зачаточных мешков, необычные характеристики молекулы главного комплекса гистосовместимости и Т-клеток, делают этих животных незаменимыми при исследованиях в области иммунологии и онкологии. Также хомяки подвержены таким инфекционным заболеваниям человека, как лейшманиоз, токсоплазмоз, сифилис [5], микоплазменная инфекция. Сирийские хомяки — единственные животные, у которых возможно развитие спонтанного тромбоза [6]. На сирийских хомяках моделируется эпилепсия, кардиомиопатия, они являются недорогой и легко воспроизводимой моделью таких широко распространенных заболеваний, как атеросклероз, сахарный диабет и кариез [7].

Тем не менее, мы не обнаружили каких-либо литературных данных об исследовании клеток хомяков, которые могли бы использоваться для терапии вышеуказанных заболеваний в моделях на животных.

Одним из наиболее достоверных способов определения принадлежности той или иной культуры клеток к популяции ММСК является исследование их способности к дифференцировке в различных направлениях. ММСК *in vitro* могут дифференцироваться в остеобласты, хондробласты, адипоциты, а также под действием некоторых факторов могут проходить «трансдифференцировку» в клетки немезенхимного ряда, такие как нейроны [8], гепатоциты [9] и др.

Мы исследовали дифференцировочный потенциал ММСК жировой ткани хомяков в сравнении с ММСК жировой ткани крыс. Результаты данной работы и сделанные выводы позволят эффективно исследовать возможности апробации клеточной терапии ряда заболеваний человека на моделях с применением сирийских хомяков.

Материал и методы

Выделение и культивирование ММСК. ММСК были выделены из подкожной и висцеральной жировой ткани взрослых самцов крыс *Rattus norvegicus* линии Wistar и сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* (Питомник лабораторных животных «ГУЦИНО», РФ). Животные содержались на стандартном рационе вивария и имели свободный доступ к воде. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в КФУ, рекомендациям местного этического комитета и национальным законам [10]. Животным выполнялась декапитация 2с целью избежать влияния наркотизирующего средства на ход и результаты эксперимента.

Все манипуляции по выделению ткани и работы с культурами клеток проводились в стерильных условиях при ламинарном токе воздуха.

Стромально-васкулярная фракция клеток была получена по стандартной методике [11] в результате инкубации жировой ткани с 0,2% раствором коллагеназы краба (Биолот, Россия) в DPBS в течение 1 ч при 37°C и постоянном покачивании. Полученные клетки культивировали на среде α -MEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% сыворотки плодов коров (FBS, ПанЭко, Россия), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин (ПанЭко, РФ) и 1 нг/мл основного фактора роста фибробластов человека (FGF2, Sigma, США). Не прикрепившиеся к пластику клетки были удалены через 48 ч при смене среды. Культуры клеток поддерживались в течение пяти пассажей. Пересев осуществляли с помощью 0,25% раствора трипсина-EDTA (Gibco, США).

Дифференцировка ММСК. Для исследования способности полученных клеточных культур к дифференцировке клетки третьего пассажа были посеяны на 12-луночные планшеты по 30 тыс. клеток на лунку и инкубировались в ростовой среде α -MEM с добавлением 1 нг/мл FGF2 до получения монослоя (48 ч). В дальнейшем для индукции дифференцировки клеточные культуры инкубировали со специальными средами. Дифференцировку осуществляли в трех направлениях: в остеогенном, адипогенном и нейрогенном.

Для остеогенной дифференцировки использовали среду α -MEM с добавлением 10% FBS, 100 нМ дексаметазона (Sigma, США), 0,5 μ M 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия). В качестве контрольной среды использовали среду α -MEM с добавлением 10% FBS, 0,5 μ M 2-фосфата аскорбиновой кислоты, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин. С 10 сут. инкубации в среду для остеогенной дифференцировки, так же, как и в контрольную среду, добавляли 0,2 μ M раствора β -глицерофосфата (Sigma, США) [11].

Для индукции адипогенной дифференцировки использовали среду DMEM High glucose (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% FBS, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин, 1 μ M дексаметазона, 100 μ M индометацина (Sigma, США), 500 μ M 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX, Sigma, США) и 10 μ g/ml инсулина (Sigma, США). С 10 сут. среду заменяли на поддерживающую, отличающуюся отсутствием дексаметазона, индометацина и IBMX. В качестве контрольной среды на всех этапах использовали DMEM High glucose с добавлением 10% FBS, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин [11].

Для нейрогенной дифференцировки посев клеток осуществляли на лунки, покрытые поли-L-лизиним. Использовали дифференцировочную среду NBM (Neural basal media, Gibco, США) с добавлением 1% FBS, 5% лошадиной сыворотки (Биолот, Россия), добавок N2 и B27 (Invitrogen, США), 10 мкг/мл трансферрина (Sigma, США), 60 мкМ путресцина (Sigma, США), 25 мкг/мл инсулина, 0,02 мкМ прогестерона (Sigma, США), 0,5 мкМ ретиноевой кислоты (Sigma, США), антибиотика и 10 нг/мл нейротрофического фактора мозга (BDNF, Sigma, США).

Контрольной средой послужила среда α -MEM с добавлением 10% сыворотки плодов коров (FBS), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин [12].

Анализ дифференцировки. Осуществляли ежедневное прижизненное наблюдение за культурами клеток с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия) методами фазово-контрастной и световой микроскопии.

Для установления факта дифференцировки в определенных направлениях на 20 сут. инкубации с дифференцировочными средами культуры клеток фиксировали охлажденным метанолом в течение 20 мин при -20°C , проводили цитохимическое окрашивание и использовали иммунофлуоресцентный метод определения экспрессии специфических белков.

Для определения минерализации, являющейся признаком остеогенной дифференцировки, использовали реакцию Van Kossa с 2% нитратом серебра. Эта реакция основана на связывании ионов серебра с фосфатными группами. Полученное соединение подвергается фотохимической деградации (в теч-

ние 1 ч при ярком освещении) с выделением ионов серебра, придающим минеральным депозитам серо-коричневый цвет.

Для выявления дифференцировки в адипогенном направлении использовали качественную реакцию на нейтральные жиры с красителем Oil Red O (Sigma, США), окрашивающим жировые включения в красный цвет. Ядра клеток докрасивали раствором гематоксилина (Sigma, США).

Факт нейрогенной дифференцировки определяли по экспрессии нейрональных маркеров, таких как $\beta 3$ -тубулин, глиофибрилярный кислый белок GFAP, нейрофиламент L. Применяли иммунофлуоресцентный метод с использованием специфических антител к вышеуказанным белкам (Santa Cruz, США, sc-51670, sc-9065, sc-25652, соответственно) и вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами Alexa 488 и 555 (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями фирм-производителей. Для окрашивания ядер использовали DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). Микроскопию выполняли на инвертированном флуоресцентном микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Антитела, использовавшиеся в работе

Характеристика антигена	Характеристика антитела по данным производителя
$\beta 3$ -тубулин – компонент микротрубочек, специфичный для нейронов	Моноклональные IgG1 мыши к $\beta 3$ -тубулину человека, мыши и крысы. sc-51670, Santa Cruz, США. Использованное разведение 1:100
GFAP – глиофибрилярный кислый белок – промежуточный филамент, экспрессируемый во многих клетках нервной системы, преимущественно в астроцитах, эпендимоцитах и некоторых других	Поликлональные IgG кролика к GFAP человека, мыши и крысы. sc-9065, Santa Cruz, США. Использованное разведение 1:100
Нейрофиламент L – промежуточный филамент, один из основных компонентов цитоскелета нейронов, обеспечивающий нормальный рост аксонов	Поликлональные IgG кролика к нейрофиламенту L человека, мыши и крысы. sc-9065, Santa Cruz, США. Использованное разведение 1:100

Результаты

До начала процедуры индукции дифференцировки ММСК крысы и хомяка 5 пассажа имели типичную для этих клеток фибробластоподобную форму. При культивировании ММСК крысы и хомяка в остеогенной среде наблюдали изменение формы клеток с веретеновидной на кубическую, свойственную остеобластам. Реакция Van Kossa выявила наличие значительных минеральных отложений в культурах ММСК как крысы, так и хомяка (рис. 1А, В), в то время как в культурах, инкубированных в контрольной среде, таковых не наблюдалось (рис. 1Б, Г).

В культурах ММСК крысы и хомяка с 10–12 сут. инкубации со средой для адипогенной дифференцировки отмечали появление жировых микровезикул в цитоплазме клеток при витальной микроскопии. В последующем при окрашивании фиксированных культур Oil Red O на 20 сут. инкубации в культурах ММСК наблюдали большое количество клеток с морфологией, типичной для адипоцитов (рис. 2А, В): обилие жировых везикул различных размеров, окрашенных Oil Red O в красный цвет, и эксцентрично расположенное ядро. В клеточных культурах, инкубированных в контрольной среде,

признаков адипогенной дифференцировки не выявили (рис. 2Г, Б).

При флуоресцентной микроскопии культур клеток, подвергнутых нейрогенной дифференцировке и окрашенных с применением антител к белкам, специфическим для нервной ткани, наблюдали появление положительно окрашенных колоний (рис. 3Б) и отдельных крупных клеток (рис. 3А, В) с нейроноподобной морфологией и наличием большого количества длинных тонких отростков. Следует отметить, что в то время как вышеописанные клетки и их колонии в культуре ММСК хомяка встречались довольно часто (рис. 4), в культуре клеток крысы их было обнаружено значительно меньше (рис. 5). Вероятно, это указывает на более высокую способность ММСК хомяков к нейрогенной дифференцировке при культивировании на применяемой дифференцировочной среде или недостаточную ее оптимизацию для дифференцировки ММСК крысы. Клетки, экспрессирующие нейральные маркеры, также в единичных экземплярах встречались в культурах клеток, инкубированных с контрольной средой, что указывает на выраженную гетерогенность популяции ММСК жировой ткани.

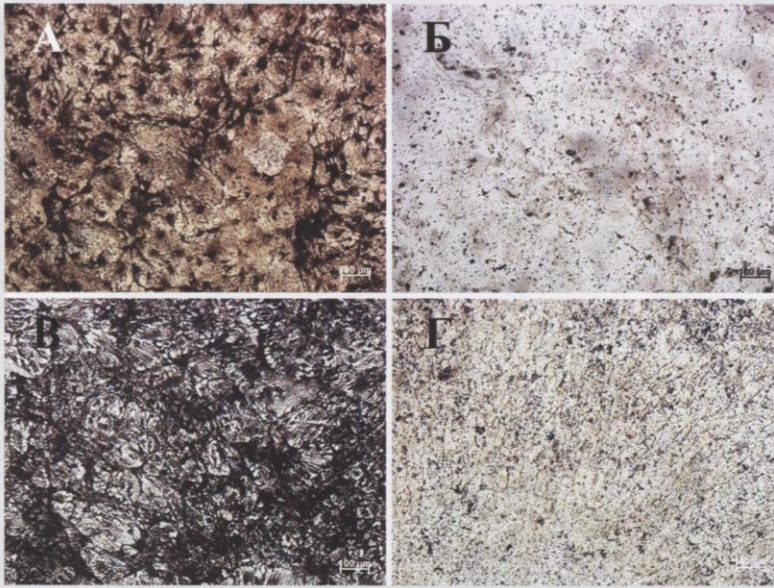


Рис. 1.
ММСК жировой ткани после индукции остеогенной дифференцировки в течение 20 сут.:
А – ММСК хомяка, остеогенная дифференцировка;
Б – ММСК хомяка, контроль;
В – ММСК крысы, остеогенная дифференцировка;
Г – ММСК крысы, контроль.
Окраска: реакция Van Kossa

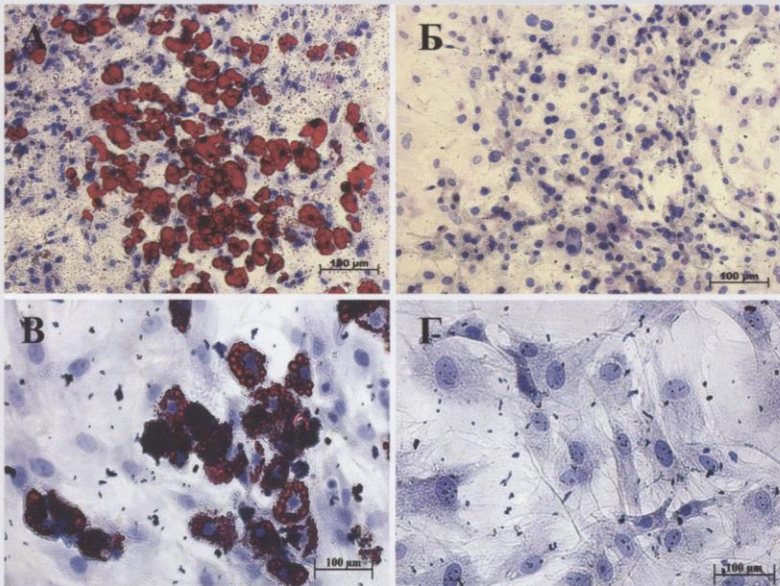


Рис. 2.
ММСК жировой ткани после индукции адипогенной дифференцировки в течение 20 сут.:
А – ММСК хомяка, адипогенная дифференцировка;
Б – ММСК хомяка, контроль;
В – ММСК крысы, адипогенная дифференцировка;
Г – ММСК крысы, контроль.
Окраска: Oil Red O, гематоксилин

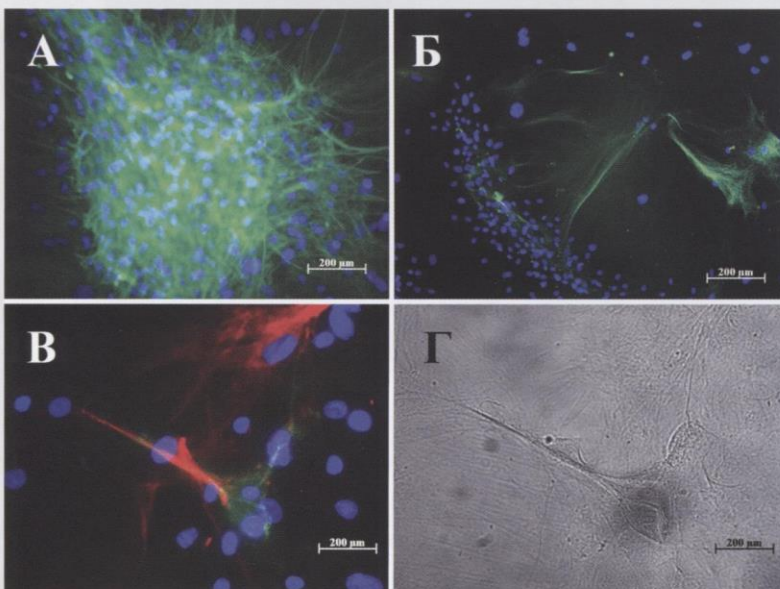


Рис. 3.
ММСК жировой ткани хомяков после индукции нейрогенной дифференцировки в течение 20 сут.:
А, Б – экспрессия $\beta 3$ -тубулина (зеленый);
В – экспрессия $\beta 3$ -тубулина (красный) и нейрофиламента-L (зеленый);
Г – нейроноподобная клетка в культуре.
А, Б, В – иммунофлуоресцентная микроскопия;
Г – фазово-контрастная микроскопия.
Окраска ядер: DAPI

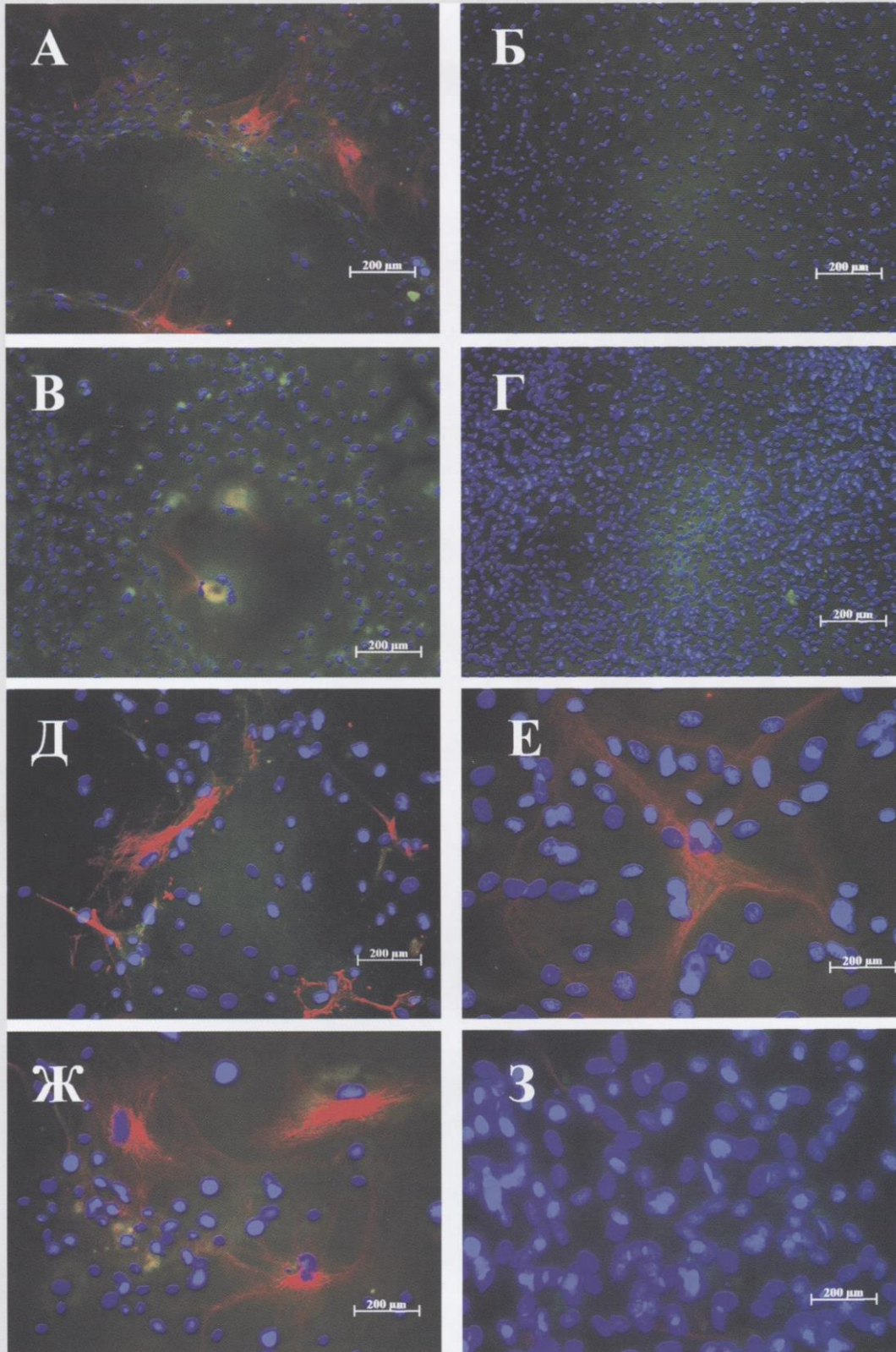


Рис. 4. ММСК жировой ткани после индукции нейрогенной дифференцировки в течение 20 сут.: А – ММСК хомяка, нейрогенная дифференцировка; Б – ММСК крысы, нейрогенная дифференцировка; В – ММСК хомяка, контроль; Г – ММСК крысы, контроль; Д – ММСК хомяка, нейрогенная дифференцировка; Е – ММСК крысы, нейрогенная дифференцировка; Ж – ММСК хомяка, контроль; З – ММСК крысы, контроль. Флуоресцентная микроскопия. А–Г – $\beta 3$ -тубулин (красный) и GFAP (зеленый); Д–З – $\beta 3$ -тубулин (красный) и нейрофиламент-L (зеленый). Окраска ядер: DAPI

Обсуждение

В результате проведенного исследования определен потенциал к дифференцировке ММСК жировой ткани крыс и хомяков. Впервые получены и охарактеризованы ММСК жировой ткани хомяков. Показана способность ММСК хомяков дифференцироваться *in vitro* в клетки мезенхимного ряда (успешно индуцирована остеогенная и адипогенная дифференцировка), возможность трансдифференцировки в немезенхимном направлении (факт нейрогенной дифференцировки определен на основании экспрессии клетками белков, специфичных для нервной ткани). Полученные данные позволят в дальнейшем успешно моделировать ряд заболеваний человека на крысах и хомяках и исследовать возможности кле-

точной терапии с применением аллогенной трансплантации стволовых клеток при различных патологиях.

Благодарности

Выполнение данного научного исследования финансируется за счёт государственного контракта ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации № 16.552.11.7008 и грантами РФФИ (12-04-01028-а, 12-04-31607). Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Терских В.В. Биологические особенности и терапевтический потенциал стромальных клеток жировой ткани. В: Пластическая хирургия и косметология, 2010: 613–22.
2. Повещенко О.В., Ким И.И., Ульянов Е.В. и др. Способы выделения и условия культивирования мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из различных источников. Бюллетень СО РАМН 2008; 5: 90–5.
3. Bobis S J., Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. Folia Histochem. Cytobiol. 2006; 44(4): 215–30.
4. Thomas M.A., Spencer J.F., La Regina M.C. et al. Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors. Cancer Res. 2006; 66(3): 1270–6.
5. Kajdacsy-Balla A., Howeedy A., Bagasra O. Syphilis in the Syrian hamster. A model of human venereal and congenital syphilis. Am. J. Pathol. 1987; 126(3): 599–601.
6. McMartin D.N., Dodds W.J. Animal model of human disease: atrial thrombosis in aged Syrian hamsters. Am. J. Pathol. 1982; 107(2): 277–9.

7. Susan V., Gibson D., Brady A.G. et al., editors. Syrian hamsters: viral, parasitic, and noninfectious diseases. Laboratory animal medicine and science series II. Alabama: University of South Alabama; 2000.
8. Глушкова Т.Г., Маркова В.И. Нейрогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток. Морфологические ведомости 2011; 1: 132–5.
9. 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; 12(36): 5834–45.
10. Генин А. М., Капланский А.С. Биоэтические правила проведения исследований на человеке и животных в авиационной, космической и морской медицине. Авиакосмическая и экологическая медицина 2001; 4: 14–20.
11. Bunnell B.A., Flaat M., Gagliardi C. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods 2008; 45(2): 115–20.
12. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp. Neurol. 2000; 164(2): 247–56.

Поступила 10.08.2012