

УДК 57.085.23

М.Б. Петрова, Е.А. Харитоновна, Н.В. Павлова, Н.В. Костюк, И.В. Стручкова, Н.В. Исакова

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ: ЦИТОФЕНОТИПЫ И ОРГАНИЗАЦИЯ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВЕЩЕСТВА

Кафедра биологии

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России

Ультраструктурное исследование клеточного монослоя и межклеточного вещества в культуре клеток жировой ткани крыс обнаружило три субпопуляции. В цитоплазме клеток преобладающей субпопуляции адипоцитарного фенотипа выявлялись крупные липидные капли, имеющие тенденцию к слиянию. Сами клетки располагались группами в просветленном межклеточном пространстве с единичными фибриллами, следовательно, поддерживали адгезию преимущественно за счет искусственного субстрата. Организация цитолеммы, ядра и органелл клеток второй субпопуляции свидетельствовала об их активном функциональном состоянии. В околкеклеточном окружении обнаруживались фибриллярные структуры, отсутствующие в цитоплазме. Морфология клеток третьей фибробластоподобной субпопуляции указывала на активную белок-синтетическую функцию. В периферических участках цитоплазмы этих клеток в значительном количестве обнаруживались волокнистые структуры, иногда заканчивающиеся в области десмосом, а во внеклеточном пространстве располагались протяженные фибриллярные структуры, идентичные по диаметру и плотности внутриклеточным. Сформированный внеклеточный матрикс сохранял тенденцию к локализации вокруг клеток-продуцентов. Неоднородность клеточного монослоя может являться следствием гетерогенности исходной популяции либо указывать на процессы дифференцировки, спонтанно происходящие в стареющей культуре.

Ключевые слова: *мезенхимальные стромальные клетки, ультраструктурная организация, клеточные фенотипы.*

MESENCHYMAL STROMAL CELLS OF ADIPOSE TISSUE: CYTOPHENOTYPES AND ORGANIZATION OF INTERCELLULAR SUBSTANCE

M.B. Petrova, E.A. Kharitonova, N.V. Pavlova, N.V. Kostuk, I.V. Struchkova, N.V. Isakova

Tver State Medical University

An ultrastructural study of the cell monolayer and the intercellular substance in the cell culture of the rat adipose tissue revealed the presence of three subpopulations of cells. In the cytoplasm of the cells of the predominant subpopulation of the adipocytic phenotype, large lipid droplets with a tendency to fusion were detected. Cells of the adipocyte phenotype were located as groups in the enlightened intercellular space with single fibrils, therefore, they maintained adhesion mainly due to an artificial substrate. The organization of the cytolemma, nucleus, and organelles of the cells of the second subpopulation indicated their active functional state. In the pericellular space, fibrillar structures were found that were absent in the cytoplasm. The cell morphology of the third fibroblast-like subpopulation indicated an active protein-synthetic function. In the peripheral areas of the cytoplasm of these cells a significant number of fibrous structures were found, sometimes ending in the desmosome region, and in the extracellular space there were extended fibrillar structures identical in diameter and density to the intracellular ones. The formed extracellular matrix retained a tendency to localize around the producer cells. The heterogeneity of the cell monolayer may be a consequence of the heterogeneity of the initial population or indicate the differentiation processes that occur spontaneously in an aging culture.

Key words: *mesenchymal stromal cells, ultrastructural organization, cell phenotypes.*

Введение

Успехи последних лет в молекулярной биологии и доступность лабораторных технологий позволили ученым продвинуться в области культуральных исследований и клеточных технологий [1–2]. Изучение стволовых клеток показало не только перспективность их регенераторных и регуляторных свойств, но и потенциальную опасность применения [3–7]. Морфологическая и функциональная гетерогенность мезенхимальных стромальных клеток (МСК), обусловленная как неоднородностью популяций стволовых клеток в живом организме, так и методическими особенностями их выделения, культивирования и се-

лекции *in vitro*, затрудняет интерпретацию данных, полученных в разных лабораториях [8–9]. Выделение МСК подразумевает ферментативную обработку биологического материала с последующей селекцией клеток, обладающих адгезией к культуральному пластику [2]. При использовании столь неспецифического подхода свойства поверхности субстрата не только определяют клеточный состав первичных культур, но и детерминируют морфологические особенности популяций в ходе дальнейшего пассирования. По наблюдениям ряда исследователей, через 3–4 субкультивирования популяции МСК приобретают однородность [10–11], другие авторы обнару-

живают гетерогенность клеточных линий и на более поздних пассажах [9]. Как правило, клетки типировуют с помощью проточной цитофлуориметрии и светооптического изучения по экспрессии поверхностных и внутриклеточных маркеров, по основным морфологическим параметрам и пролиферативной активности [12]. Установлено, что МСК из костного мозга, жировой ткани, кожи, плаценты и тимуса человека при выделении и культивировании в идентичных условиях обладают сходными морфологическими характеристиками и практически не отличаются экспрессией основных маркерных генов [13]. Однако, несмотря на интенсивное изучение этих клеток, многие аспекты их биологии остаются неясными, в том числе их ультраструктурная организация, которая позволяет подробнее дифференцировать клеточные фенотипы, не различимые на светооптическом уровне.

Цель исследования: изучить ультраструктурную организацию субпопуляций и межклеточного вещества мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани крыс и дифференцировать клеточные фенотипы, не различимые на светооптическом уровне.

Материал и методы

В работе использовали биологический материал беспородных белых самок крыс ($n = 14$) весом 150–200 г, которые содержались в стандартных условиях вивария. Содержание животных и все манипуляции с ними проведены в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Под ингаляционной анестезией парами эфира подкожный жир получали из паховой области крыс; выведение животных из эксперимента осуществлялось путем передозировки эфирного наркоза в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 ЕЕС. Выделение МСК проводили по P. Zuk et al. [2]. Измельченные образцы жировой ткани дезинтегрировали раствором коллагеназы I типа (200 ед./мл) в среде Игла в модификации Дульбеко (DMEM, «Invitrogen», США) со стрептомицином и пенициллином (500 ед./мл) при 37°С в течение 60 минут. После инактивации фермента равным объемом среды DMEM, содержащей 10%

фетальной телячьей сыворотки («Gibco», США), клетки осаждали центрифугированием. Осадок отбирали, ресуспендировали, очищали от эритроцитов гемолизом. Клетки повторно центрифугировали, пропускали через нейлоновое сито 100 мкм и высевали в чашки Петри. Клетки выращивали на питательных средах DMEM, RPMI-1640 или DMEM/F12 соответственно с добавлением антибиотиков и 10% фетальной телячьей сыворотки. В работе использовали клетки первого–четвертого пассажей.

Приготовление препаратов культуры клеток для электронной микроскопии проводилось по стандартным протоколам в модификации для большого количества случайно ориентированных клеток, позволяющей сохранить морфологию прикрепленной культуры. Клетки фиксировались непосредственно в культуральном сосуде без предварительного отделения от субстрата, затем снимались при помощи шпателя. Перед фиксацией клетки дважды отмывались от культуральной среды 2 мл фосфатного буфера по 1 мин. Фиксировали при комнатной температуре в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (0,1 М рН 7,2). Через 30 мин культуру клеток отмывали от фиксатора тем же буфером 3 раза по 5 минут, затем шпателем отделяли от дна культуральной посуды, добавляли буфер и осаждали центрифугированием со скоростью 1000 об./мин в течение 5 мин. Осадок, промытый буфером, подвергали постфиксации в 1% растворе OsO₄ в течение 1 часа. Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме PowerTomeX (Великобритания), образцы просматривали под электронным микроскопом LVEM 5 (Delong Instruments, Канада) и Philips CM 10 (Япония).

Результаты и их обсуждение

Анализ результатов электронного микроскопирования культуры клеток и межклеточного вещества экспериментальных животных 4-го пассажа, инкубированных в течение 25 дней, показал существование трех клеточных субпопуляций, отличающихся фенотипически.

В преобладающей субпопуляции клетки располагались компактно, плотными группами в просветленном межклеточном пространстве (рис. 1а, б). В суб-

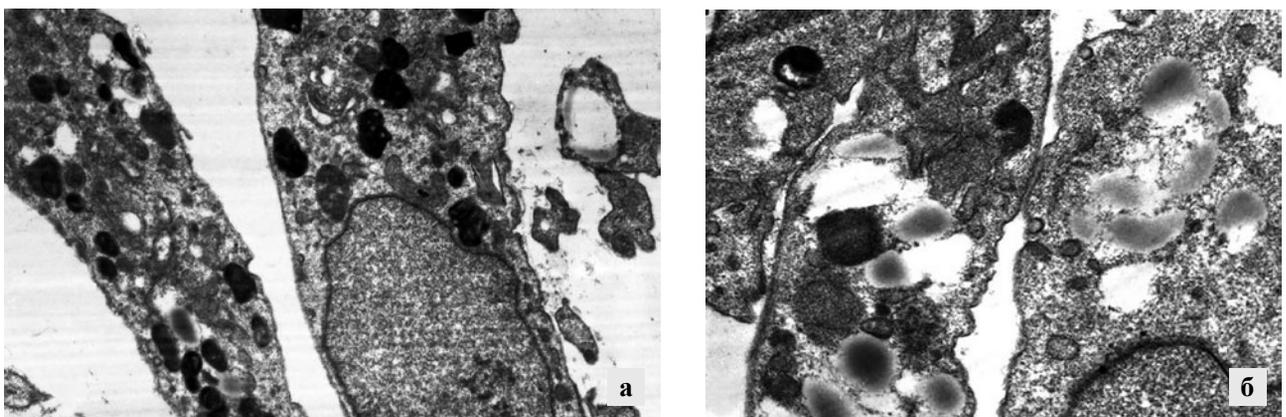


Рис. 1. Клетки адипогенной субпопуляции: а – группа клеток в просветленном экстрацеллюлярном матриксе, ×12 тыс.; б – липидные капли в периферических участках цитоплазмы, ×17 тыс.

страте экстрацеллюлярно обнаруживались только единичные фибриллы и их пучки незначительной длины. Цитолеммы клеток имели относительно ровные очертания либо выявлялись их неглубокие инвагинации. На отдельных участках клетки контактировали цитолеммами по принципу «шип–гнездо», более сложные виды контактов (десмосомы) не выявлялись. Ядра характеризовались вытянутой формой, в ядерном матриксе хроматин был распределен равномерно, определялись 1–2 ядрышка.

Обращал на себя внимание тот факт, что в цитоплазме не выявлялись фибриллярные структуры. Профили эндоплазматического ретикулаума гранулярного типа, расширенные и разветвленные, были заполнены веществом средней электронной плотности. Митохондрии единичные, умеренных размеров. Рибосомы были распределены равномерно в цитоплазме, полисом не образовывали. Характерной чертой клеток этого цитофенотипа являлось наличие крупных липидных капель разного диаметра, имеющих тенденцию к слиянию и оттесненных от ядра клетки к ее периферии (рис. 1б). Отмеченная особенность позволяет нам отнести клетки этого фенотипа к адипогенной линии дифференцировки.

Клетки второй субпопуляции характеризовались вытянутой формой, ядро каждой из них при этом было расположено центрально и занимало значительное пространство, повторяя форму клетки (рис. 2а). Перинуклеарное пространство ядра выглядело слегка расширенным, причем промежутков между наружной и внутренней мембранами по всему периметру был абсолютно равномерным. Хорошо идентифицирующиеся поры кариолеммы были расширены, в околопоровом пространстве цитоплазмы определялись многочисленные рибосомы. Хроматин отличался гомогенностью организации и был представлен в основном эухроматиновой фракцией, в ядрах выявлялись 1–2 ядрышка.

Околоядерный объем цитоплазмы характеризовался большим количеством органелл и включений. Каналы эндоплазматической сети отличались большей протяженностью в сравнении с таковыми в клетках первой субпопуляции, преобладал грану-

лярный тип ретикулаума. Мембраны этих канальцев контактировали с цитолеммой, часто они были расположены около ее инвагинаций. В отдельных полях зрения наблюдалась экскреция фибриллярного белка при опорожнении везикулярных структур. Митохондрии были вытянуты вдоль ядра, в их матриксе определялись многочисленные кристы.

В периферических участках цитоплазма этих клеток отличалась большей гомогенностью, в ее объеме встречались лишь единичные митохондрии, многочисленные рибосомы располагались преимущественно свободно в гиалоплазме (рис. 2б). Так же как и в первом цитофенотипе обнаруживались везикулярные образования с гомогенным и электронно-плотным матриксом. Внутриклеточные фибриллярные структуры в цитоплазме отсутствовали, однако, в отличие от предыдущего фенотипа в большом количестве обнаруживались в околоклеточном пространстве (рис. 2а, б), как бы формируя основу для адгезии отростков этих клеток к субстрату.

Клетки третьей субпопуляции были морфологически распознаваемы по наличию немногочисленных, но очень длинных цитоплазматических отростков (рис. 3а). Цитолемма отличалась относительно ровными контурами и лишь на отдельных участках была мелкофестончатой, образуя инвагинации. Среди многочисленных рибосом преобладали свободно-расположенные, не фиксированные на мембранах, но вместе с тем встречались и полисомные комплексы. Единичные каналы эндоплазматической сети преимущественно гранулярного типа отличались меньшей протяженностью в сравнении с клетками второй субпопуляции. Очевидно, указанная особенность может свидетельствовать о том, что внутриклеточный транспорт веществ осуществлялся преимущественно диффузно. В цитоплазме так же, как и у клеток первой субпопуляции, значительный объем занимали крупные, округлые, имеющие тенденцию к слиянию, везикулярные образования с электронно-плотным матриксом.

Важнейшей, на наш взгляд, особенностью клеток этого цитофенотипа были волокнистые структуры в цитоплазме, напоминающие миофиламенты (рис. 3а). В отдельных клетках они были

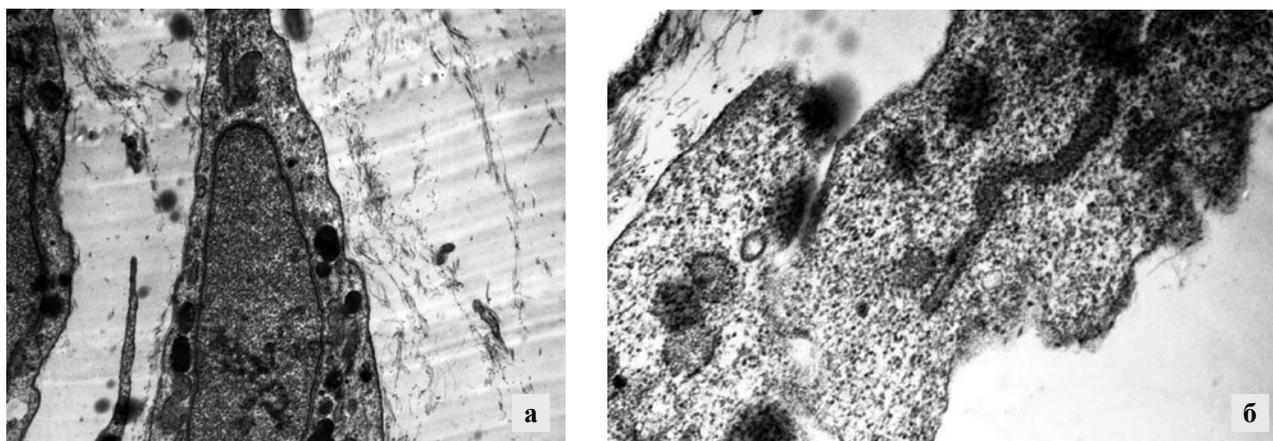


Рис. 2. Клетки второй субпопуляции: а – ядро, повторяющее форму клетки; фибриллярные структуры в межклеточном матриксе, ×12 тыс.; б – органеллы периферических участков гиалоплазмы, ×34 тыс.

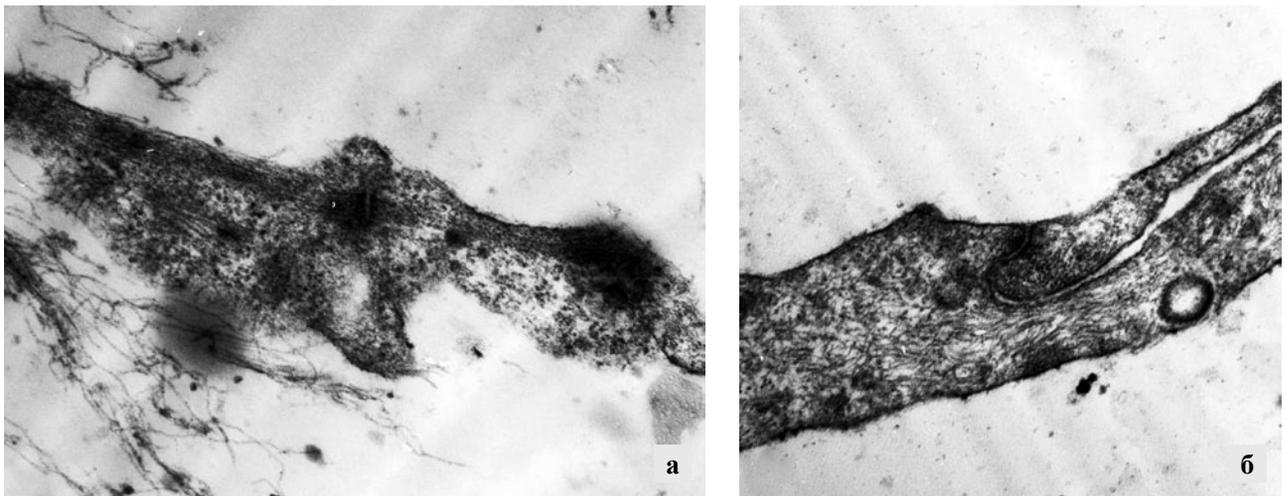


Рис. 3. Клетки третьей субпопуляции: а – десмосомы между цитоплазматическими отростками двух контактирующих клеток, $\times 34$ тыс.; б – контакт «шип-гнездо», рыхлые пучки волокон в цитоплазме, $\times 34$ тыс.

расположены достаточно хаотично, иногда крест-накрест. В других участках цитоплазмы, чаще периферических, отмечались упорядоченно ориентированные конгломераты отдельно различимых волокон, расположенных параллельно друг другу. Отчетливо можно было выделить два их вида: в первом фибриллы были достаточно рыхло расположены с участками гиалоплазмы между ними, второй отличался очень компактной организацией без просветов гиалоплазмы.

Цитолеммы клеток этой субпопуляции характеризовались формированием двух типов контактов отростков. Первый тип контактов по принципу «шип-гнездо» не отличался упорядоченным расположением пучков волокон, а межклеточное пространство имело щелевидную форму (рис. 3б). Второй тип контактов был представлен десмосомами с характерной организацией пучков микрофиламентов в подцитолемной области (рис. 3а).

Данный фенотип клеток характеризовался выведением в субстрат значительного количества фибриллярных структур значительной протяженности, часто собранных в рыхлые волокнистые пучки. Нет сомнения во внутриклеточном происхождении этих волокон, поскольку наблюдался экзоцитоз с опорожнением везикул за пределы клетки, а фибриллярные структуры, расположенные внеклеточно, были идентичны по диаметру и плотности внутриклеточным (рис. 3а). Указанные особенности морфологии этого цитофенотипа позволяют нам отнести их к фибробластоподобным.

Заключение

Таким образом, ультраструктурный анализ культуры МСК жировой ткани крысы показал неоднородность клеточной популяции, которая может являться следствием гетерогенности исходной популяции либо указывать на процессы дифференцировки, спонтанно происходящие в стареющей культуре. Обнаружено, что формирование внеклеточного матрикса за 25 дней культивирования сохраняло тенденцию

к локализации вокруг клеток-продуцентов, тогда как клетки адипоцитарной специализации поддерживали адгезию преимущественно за счет искусственного субстрата. Эту особенность полезно учитывать при планировании длительного культивирования дифференцированных клеток.

Литература/References

1. *Chen, J.* Cellular and molecular comparison of redifferentiation of intramuscular- and visceral-adipocyte derived progeny cells / J. Chen, M.V. Dodson, Z. Jiang. – Text: visual // Jiang International Journal of Biological Sciences. – 2010. – № 6 (1). – P. 80–88.
2. *Zuk, P.A.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian. – Text: visual // Molecular Biology of the Cell. – 2002. – № 13. – P. 4279–4295.
3. *Ельчанинов, А.В.* Направления дифференцировки аллогенных мультипотентных стромальных клеток в регенерирующей печени / А.В. Ельчанинов, Т.Х. Фатхудинов, И.В. Арутюнян. – Текст: непосредственный // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2017. – № 6 (4). – С. 15–20.
4. *El'chaninov, A.V.* Napravlenija differencirovki allogennyh mult'ipotentnyh stromal'nyh kletok v regenerirujushhej pečeni / A.V. El'chaninov, T.H. Fathudinov, I.V. Arutjunjan. – Текст: непосредственный // Zhurnal anatomii i gistopatologii. – 2017. – № 6 (4). – С. 15–20.
4. *Зеленкова, В.Н.* Возможности применения стволовых клеток в оториноларингологии / В.Н. Зеленкова, О.А. Голубовский. – Текст: непосредственный // Рос. оториноларингология. – 2006. – № 1. – С. 92–94.
5. *Zelenkova, V.N.* Vozmozhnosti primenenija stvolovyh kletok v otorinolaringologii / V.N. Zelenkova, O.A. Golubovskij. – Текст: непосредственный // Ros. otorinolaringologija. – 2006. – № 1. – С. 92–94.
5. *Laino, G.* An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering / G. Laino, A. Graziano, R. D'Aquino – Text: visual // J. Cell. Physiol. – 2006. – № 206 (3). – P. 693–701.
6. *Fukuchi, Y.* Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell / Y. Fukuchi, H. Nakajima, D. Sugiyama. – Text: visual // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22. – № 5. – P. 649–658.
7. *Smith, J.R.* Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma / J.R. Smith, R. Pochampally, A. Perry. –

Text: visual // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22. – № 5. – P. 823–831.

8. Костюк, Н.В. Сравнение дифференцировки первичных адипоцитов и адипоцитов, полученных индукцией мезенхимных стромальных клеток жировой ткани / Н.В. Костюк, М.Б. Белякова, М.В. Миняев. – Текст: непосредственный // Технологии живых систем. – 2017. – Т. 14. – № 4. – С. 12–20.

Kostjuk, N.V. Sravnenie differencirovki pervichnyh adipocitov i adipocitov, poluchennyh indukciej mezenhimnyh stromal'nyh kletok zhirovoj tkani / N.V. Kostjuk, M.B. Belyakova, M.V. Minjaev. – Tekst: neposredstvennyj // Tehnologii zhivyh sistem. – 2017. – T. 14. – № 4. – S. 12–20.

9. Baer, P.C. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity / P.C. Baer, H. Geiger. – Text: electronic // Stem Cells International. – 2012. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/812693> (дата обращения: 14.01.2018).

10. Лавров, А.В. Гетерогенность ядер и пролиферативный потенциал МСК-подобных клеток в культуре стромально-васкулярной фракции жировой ткани / А.В. Лавров, С.А. Смирнихина. – Текст: непосредственный // Цитология. – 2010. – Т. 52. – № 8. – С. 616–620.

Lavrov, A.V. Geterogennost' jader i proliferativnyj potencial MSK-podobnyh kletok v kul'ture stromal'no-vaskuljarnoj frakcii zhirovoj tkani / A.V. Lavrov, S.A. Smirnihina. – Tekst: neposredstvennyj // Citologija. – 2010. – T. 52. – № 8. – S. 616–620.

11. Паюшина, О.В. Гетерогенность и возможная структура популяций мезенхимальных стромальных клеток / О.В. Паюшина, Е.И. Домарацкая. – Текст: непосредственный // Цитология. – 2015. – Т. 57. – № 1. – С. 31–38.

Pajushina, O.V. Geterogenost' i vozmozhnaja struktura populjacij mezenhimal'nyh stromal'nyh kletok / O.V. Pajushina, E.I. Domarackaja. – Tekst: neposredstvennyj // Citologija. – 2015. – T. 57. – № 1. – S. 31–38.

12. Романов, Ю.А. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга и жировой ткани человека: получение, характеристика, возможности дифференцировки / Ю.А. Романов, А.П. Даревская, Н.В. Мерзликina. – Текст: непосредственный // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – № 3. – С. 158–163.

Romanov, Ju.A. Mezenhimal'nye stvolovyje kletki kostnogo mozga i zhirovoj tkani cheloveka: poluchenie, harakteristika, vozmozhnosti differencirovki / Ju.A. Romanov, A.P. Darevskaja, N.V. Merzlikina. – Tekst: neposredstvennyj // Kletochnye tehnologii v biologii i medicine. – 2005. – № 3. – S.158–163.

13. Мусина, Р.А. Сравнительная характеристика мезенхимальных стволовых клеток, полученных из разных тканей человека / Р.А. Мусина, Е.С. Бекчанова, Г.Т. Сухих. – Текст: непосредственный // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – № 2. – С. 89–94.

Musina, R.A. Sravnitel'naja harakteristika mezenhimal'nyh stvolovyh kletok, poluchennyh iz raznyh tkanej cheloveka / R.A. Musina, E.S. Bekchanova, G.T. Suhih. – Tekst: neposredstvennyj // Kletochnye tehnologii v biologii i medicine. – 2005. – № 2. – S. 89–94.

Петрова Маргарита Борисовна (контактное лицо) – д. б. н., профессор, заведующая кафедрой биологии ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинской университет Минздрава России; 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4. Тел. (4822) 34-52-32; e-mail: pmargo-2612@mail.ru.