

that health education of physicians of the stomatological practice requires an extensive introduction into maternity welfare clinics for the purpose of preventing and treating diseases of the oral cavity.

**Key words:** pregnancy, diseases of oral cavity, prevention, diagnostics.

Regional Stomatological Polyclinic (Mykolaiv)

Рецензент – доц. О.В. Митченко

Buk. Med. Herald. – 2013. – Vol. 17, № 1 (65). – P. 90-92

Надійшла до редакції 07.02.2013 року

© П.В. Польовий, 2013

УДК 576.3/3.7+579.246+616-008.847.9-092.4

*Ю.В. Поляченко, Е.М. Запольська, Р.В. Салютін*

## НАПРАВЛЕНА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН, ЩО ВИДІЛЕНІ З ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова» НАМН України  
Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

**Резюме.** Проведено експериментальне дослідження з метою визначення можливості диференціювання стовбурових клітин, що виділені з жирової тканини за адипогенним напрямом.

Результати дослідження засвідчили про те, що клітини, які виділені з жирової тканини, здатні до специфічного диференціювання, а саме в остеогенному, хондрогенному та головне адипогенному напрямі, що є свідченням мультипотентності стовбурових мезенхімальних клітин жирової тканини.

Жирова тканина є альтернативним кістковому мозку джерелом мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин, які можуть бути використані для подальших досліджень із визначення можливості використання стовбурових клітин як захисту пересадженої, шляхом ліпофілінгу, аутологічної жирової тканини від тканинної резорбції.

**Ключові слова:** жирова тканина, стовбурові клітини, диференціація.

**Вступ.** Відкриття та подальше дослідження стовбурових клітин є одним із найголовніших відкриттів минулого століття. Найвідомішим джерелом стовбурових клітин є кістковий мозок, з якого було виділено мезенхімальні мультипотентні стовбурові клітини (ММСК). ММСК кісткового мозку вже декілька десятиліть використовуються в клінічній практиці [1, 2].

Однак труднощі із заготівлею кісткового мозку та отриманням з останнього достатньої кількості активних клітин (у тому числі і для проведення експериментальних досліджень) зумовлюють пошук нових альтернативних джерел стовбурових клітин [3].

В останні роки жирова тканина розглядається багатьма дослідниками як альтернативне джерело стовбурових клітин. Значна кількість активних клітин в одиниці об'єму жирової тканини та простота і безболісність процедури отримання анатомічного матеріалу (жирової тканини) зумовили значний інтерес дослідників та практичних лікарів [4].

Особливу цікавість викликає можливість використання стовбурових клітин у тому числі і тих, що виділені з жиру як системи клітинного захисту пересадженої, шляхом ліпофілінгу, аутологічної жирової тканини від тканинної резорбції [5].

Перспективність цього напрямку зумовлюється насамперед властивостями та характеристиками стовбурових клітин, а саме можливістю їх

диференціювання за різними напрямками клітинного розвитку, тобто мультипотентністю.

**Мета дослідження.** Визначити можливість диференціювання стовбурових клітин, що виділені з жирової тканини за адипогенним напрямом та наявність мультипотентних характеристик у виділених стовбурових клітин.

**Матеріал і методи.** Після евтаназії з інгвінальних ділянок мишей ліній FVB-Cg-Tg(GFP) 5Nagy/J (трансгенні за GFP) виділяли фрагменти підшкірної жирової клітковини.

Після обробки анатомічного матеріалу отримували клітинну суспензію, яку після фільтрування через клітинний фільтр із діаметром пор 70 мкм переносили в культуральні флакони з повним живильним середовищем із розрахунку  $0,12-0,15 \times 10^6$  клітин/см<sup>2</sup> культуральної поверхні.

Клітинні зразки культивували за стандартних умов, а саме в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при температурі 37°C та зволоженій атмосфері з концентрацією CO<sub>2</sub> 5%. Субкультивування проводили при досягненні культурою 80-90% конфлюентності моношару. Суспензію клітин збирали і центрифугували протягом 5 хв при 200 g, отримуючи культуру стовбурових клітин.

Як відомо, мезенхімальні клітини, що виділені з кісткового мозку, мають мультипотентні властивості, а саме здатні до диференціювання за адипогенним, хондрогенним та остеогенним напрямками [6].

© Ю.В. Поляченко, Е.М. Запольська, Р.В. Салютін, 2013

Таким чином, із метою визначення мультипотентних властивостей клітин, що виділені з жирової тканини, вони були піддані направленому диференціюванню в адипогенному, хондрогенному та остеогенному нарямах, за умов *in vitro*.

Адипогенне диференціювання проводили шляхом висівання клітин, що виділені з жирової тканини в 6-ямковий планшет у концентрації  $5 \times 10^3/\text{см}^2$ .

Через 24-ге робоче живильне середовище замінювали на диференціальне живильне середовище, що складалося з DMEM-LG, 10 % FBS, 1 % антибіотика (Ceftriaxopum), 50 мкМ індометацину, 1 мкМ дексаметазону, 0,5 мМ IBMX.

Заміну диференціального живильного середовища проводили кожні 72 години, протягом 28 днів.

Протягом цього періоду спостерігали за зміною активності проліферації клітин, їх морфології, відмічали часові інтервали змін характеристик культури.

Через різні часові проміжки (до 21 доби культивування) моношар клітин промивали PBS, фіксували 2 % охолодженим розчином формальдегіду протягом 25-30 хв, повторно промивали PBS. Зафіксований моношар клітин забарвлювали за допомогою Oil Red O та гематоксилін-еозину.

Диференціювання отриманих клітин в остеогенному та хондрогенному напрямках індукували за модифікованими методиками Li та ін., 2009 р. і Matsuda та ін., 2005 р.

Для направленного остеогенного диференціювання клітини культивували протягом 2-3 пасажів і на стадії субконфлюентного моношару проводили заміну живильного середовища для культивування на остеоіндуктивне, яке складалося з живильного середовища DMEM-F12 (Sigma, США) з додаванням 7 % FBS, а також L-аскорбінової кислоти 2-фосфату (0,05мМ), дексаметазону (100нМ) та  $\beta$ -гліцерофосфату (10мМ).

Заміну даного середовища проводили кожні 3-4 дні. Загалом клітини перебували під впливом середовища для остеогенного диференціювання

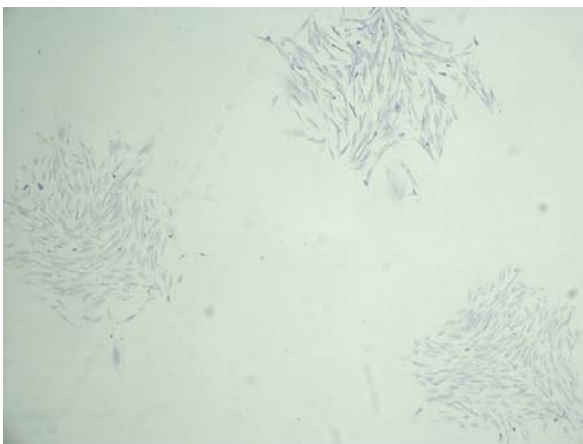


Рис. 1 Колонієутворення клітинами, що виділені з жирової тканини, забарвлення за методом Гімзи (зб. x 50)

протягом 28 днів за стандартних умов культивування.

Зафіксований моношар клітин забарвлювали за допомогою алізаринового червоного та за методом фон Косса для виявлення відкладень солей кальцію у позаклітинному матриксі, що є однією з ознак остеогенного диференціювання культури.

Для виявлення експресії лужної фосфатази, яка також є маркером остеогенного диференціювання клітин, на зафіксований моношар наносили розчин BCIP/NBT (Sigma, США) на 20-30 хв у захищеному від світла місці, відмивали дистильованою водою та оцінювали інтенсивність забарвлення.

Для хондрогенного диференціювання отримані клітини культивували протягом 2-3 пасажів і на стадії конфлюентного моношару проводили заміну живильного середовища для культивування на середовище для хондрогенного диференціювання, яке складалося з живильного середовища DMEM-HG (Sigma, США) з додаванням 7 % FBS, а також L-аскорбінової кислоти 2-фосфату (50мкг/мл), дексаметазону (39нг/мл), пірувату натрію (100мкг/мл), трансформуючого фактора росту- $\beta_3$  (TGF- $\beta_3$ , 10нг/мл) та інсуліноподібного фактора росту I (IGF-I, 100 нг/мл).

Тривалість перебування клітин під впливом хондрогенного середовища та умови культивування були аналогічні як і для клітин, що підлягали остеогенному та адипогенному диференціюванню. Зафіксований моношар клітин забарвлювали барвником на агрекан та колаген II типу.

**Результати дослідження та їх обговорення.** У клітинній культурі, що отримана шляхом обробки жирової тканини, виділяли три клітинні субпопуляції.

Першу субпопуляцію складали малі веретеноподібні клітини діаметром 10-15 мкм, які мали чітко виділене ядро та гомогенну цитоплазму.

Другий тип клітин – розміром до 40 мкм мали округлу форму з витягнутим цитоплазматичним відростком, темним ядром, яке було зміщене до клітинного краю, гетерогенною цитоплаз-

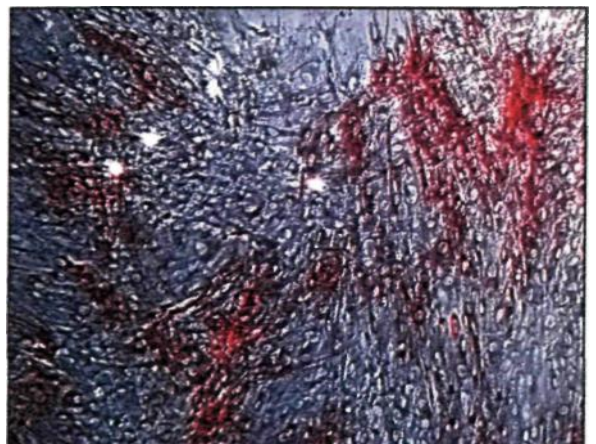


Рис. 2. Забарвлення на лужну фосфатазу культури клітин, що виділені з жирової тканини, 7-ма доба експерименту (зб. x 200)

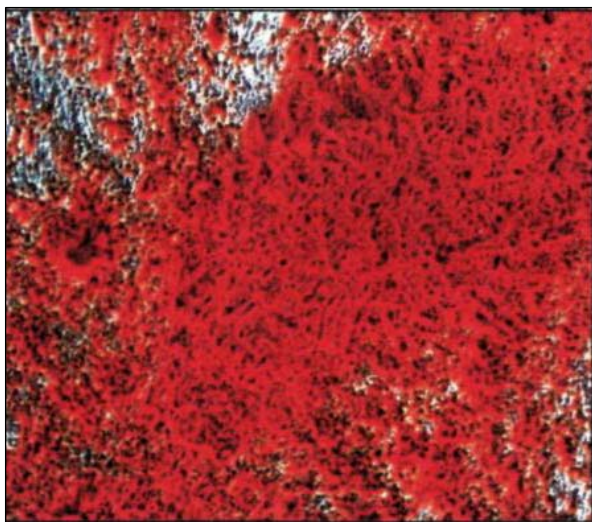


Рис. 3. Забарвлення Alizarin Red культури клітин, що виділені з жирової тканини, 28-ма доба експерименту (зб. х 200)

мою та підвищеною гранулярністю в ядерній ділянці.

У клітинній культурі домінували клітини розміром до 80 мкм, що містили значну кількість вакуолей та гранул.

Встановлено, що саме клітини зазначеної клітинної субпопуляції характеризувалися високою адгезивністю, колонієутворенням, генністю та здатні проліферувати в культурі більш ніж 72 рази (рис. 1).

Саме клітини третьої субпопуляції використовували в подальшому експериментальному дослідженні, а саме в направленому диференціюванні.

Встановлено, що культивування в остеогенному середовищі призводило до активації процесу остеодиференціювання.

Наприкінці першого тижня експерименту візуальних змін у морфології клітин не виявлено.

Однак активація процесу остеодиференціації підтверджується позитивним забарвленням індуктованих зразків на лужну фосфатазу (рис. 2).

При подальшому культивуванні клітинної культури (28-ма доба експерименту) фіксували формування мінеральних комплексів, що свідчило про подальшу остеодиференціацію клітин під впливом остеогенного живильного середовища.

Формування мінеральних комплексів визначали завдяки спеціальному методу забарвлення барвником Alizarin Red.

За допомогою барвника Alizarin Red виявляли остеобласти, що формували кісткову пластинку, забарвлювались у специфічний червоний колір, що є свідченням раннього етапу остеодиференціювання (рис. 3).

Більш пізніше остеодиференціювання клітин, що виділені з жирової тканини в остецити, підтверджувалося забарвленням за методом von Kossa.

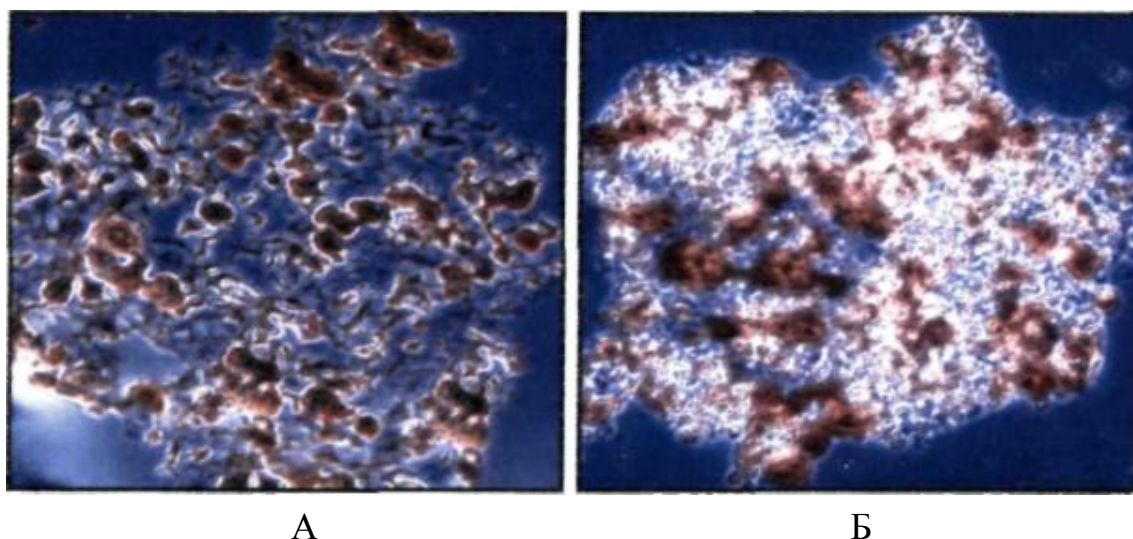
Специфічне забарвлення за методом von Kossa дозволило виявити наявність кальцифікованого матриксу та відповідну морфологію диференційованих клітин, що мали характерні вирости.

Морфометричний аналіз впливу індукційного, остеогенного живильного середовища на клітини, що виділені з жирової тканини, свідчив про те, що ефективність диференціювання клітин становила 68 %.

На 28-му добу експерименту, при внесенні клітин, що виділені з жирової тканини в хондрогенне живильне середовище, фіксували формування клітинних агрегатів, зміни морфології клітин та секрецію значної кількості позаклітинного матриксу.

Вплив індукції живильного середовища призводив до зміни клітиною своєї форми, а саме клітини набували сферичної форми.

Клітинне ядро зміщувалося до краю клітини, відмічалася характерна вакуолізація клітин, а



А

Б

Рис. 4. Хондрогенне диференціювання клітин, що виділені з жирової тканини, 28-ма доба експерименту (зб. х 200): А – забарвлення на агрекан; Б – забарвлення на колаген II типу

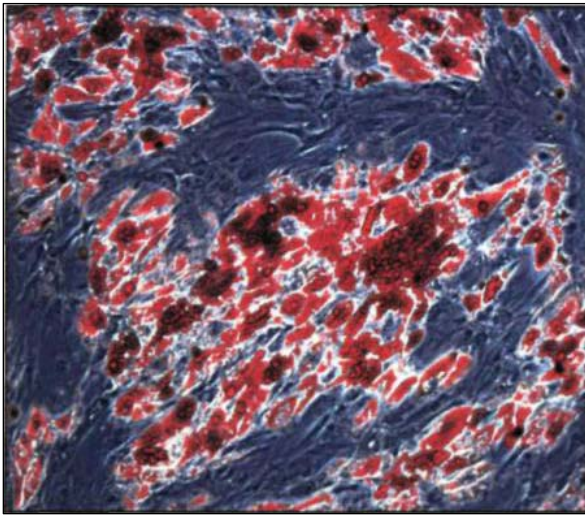


Рис. 5. Адипогенне диференціювання клітин, що виділені з жирової тканини, 28-ма доба експерименту (зб. х 200)

також наявність гелеподібного позаклітинного матриксу.

Подібні морфологічні перетворення клітин свідчать про набуття останніми характеристик клітин хрящової тканини, що підтверджувалося експресією цими клітинами основних маркерів хондрогенезу – колагену II типу та агрекану (рис. 4).

Культивування клітин, що виділені з жирової тканини в ангиогенному живильному середовищі, призводило до утворення в клітинах ліпідних вакуолей.

Цитоплазматичні вакуолі під час культивування мали тенденцію до злиття та утворення єдиного жирового включення, формуючи таким чином «кільце-печатку», яка є характерною для зрілих адипоцитів.

Клітинне ядро зміщується до периферії, а цитоплазма являє собою лише вузьку облямівку, а сама клітина набувала шароподібної форми.

Окрім того, у клітинах накопичувалися нейтральні жири, а самі клітини утворювали кластери адипоцитів.

Подібні морфологічні перетворення клітин свідчать про набуття останніми характеристик жирової тканини – адипоцитів, що підтверджувалося забарвленням Oil Red O та гематоксилином (рис. 5).

Таким чином, результати проведеного експериментального дослідження за умов *in vitro*, засвідчив, що клітини, які виділені з жирової тканини, за своєю морфологічною та культуральною характеристикою є мультипотентними мезенхімальними стовбуровими клітинами.

Отримана культура з жирової тканини мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин

у подальшому може бути використана для проведення другого етапу запланованих досліджень за умов *in vivo*.

### Висновки

1. Клітини третьої субпопуляції, що виділені з жирової тканини, характеризуються фібробластною морфологією, адгезивністю та здатністю до колонієутворення.

2. Клітини третьої субпопуляції, що виділені з жирової тканини, здатні до специфічного диференціювання, а саме в остеогенному, хондрогенному та, головне, адипогенному напрямках, що є свідченням мультипотентності стовбурових мезенхімальних клітин жирової тканини.

3. Жирова тканина є альтернативним кістковому мозку джерелом мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин.

**Перспективи подальших досліджень.** Простота та доступність отримання з жирової тканини (порівняно з кістковим мозком), мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин відкриває нові перспективи подальших досліджень у тому числі і клінічного характеру.

### Література

1. Current perspectives in therapeutic myocardial angiogenesis / T. Kinnaird, E. Stabile, S.E. Epstein [et al.] // J. Interv. Cardiol. – 2003. – Vol. 16, № 4. – P. 289-297.
2. Кирик В.М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине (обзор литературы) / В.М. Кирик, Г.М. Бутенко // Ж. Акад. мед. наук України. – 2010. – Т. 16, № 16. – С. 576-604.
3. Humpert P.M. Adult vascular progenitor cells and tissue regeneration in metabolic syndrome / P.M. Humpert, H. Eichler, A. Lammert // Vasa. – 2005. – Vol. 34, № 2. – P. 73-78.
4. Zuk P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian // Mol. Biol. Cell. – 2002. – № 13. – P. 4279-4295.].
5. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives / V. Planat-Benard, J.S. Silvestre, B.Cousin [et al.] // Circulation. – 2004. – Vol. 109. – P. 656-660.
6. Стромальные клетки предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании / А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко, Н.Г. Скоробогатова [и др.] // Ж. Акад. мед. наук України. – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 354-365.

## НАПРАВЛЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Ю.В. Поляченко, Е.М. Запольская, Р.В. Салютин

**Резюме.** Проведено экспериментальное исследование с целью определения возможностей дифференциации стволовых клеток, выделенных из жировой ткани по ангиогенному направлению.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что клетки, выделенные из жировой ткани, способны к специфическому дифференцированию, а именно в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях, что является свидетельством мультипотентности мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани.

Жировая ткань является альтернативой костному мозгу, как источнику мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, которые могут быть использованы для дальнейших исследований по изучению возможностей использования стволовых клеток в качестве защиты пересаженной, путем липофилинга аутологической жировой ткани от тканевой резорбции.

**Ключевые слова:** жировая ткань, стволовые клетки, дифференциация.

## DIRECTED DIFFERENTIATION OF STEM CELLS THAT ARE ISOLATED FROM THE ADIPOSE TISSUE

*Yu. V. Poliachenko, E. M. Zapol's'ka, R. V. Saliutin*

**Abstract.** The authors have carried out an experimental study for the purpose of determining a possibility of differentiating stem cells that are isolated from the adipose tissue according to the adipogenic orientation. The results of the research were indicative of the fact that the cells isolated from the adipose tissue are of specific differentiation, namely, an osteogenic, chondrogenic and, above all, adipogenic orientation that is an evidence of the multipotency of the stem mesenchymal cells of the adipose tissue. The adipose tissue is an alternative source to the bone marrow of multipotent mesenchymal stem cells that can be used as a protection of transplanted autologous adipose tissue from resorption by lipofilling.

**Key words:** adipose tissue, stem cell, differentiation.

SI "National Institute of Surgery and Transplantology" Named after O.O. Shalimov of Ukraine's NAMS (Kyiv)  
Coordinating Center for Transplantation of Organs, Tissues and Cells of Ukraine's MHP

Рецензент – проф. Д.Б. Домбровський

Buk. Med. Herald. – 2013. – Vol. 17, № 1 (65). – P. 92-96

Надійшла до редакції 21.11.2012 року

© Ю.В. Поляченко, Е.М. Запольська, Р.В. Салютін, 2013

УДК 616-001.3/5-06:616-092.19-085.212]-092.9

*С.М. Придруга<sup>1</sup>, Р.М. Борис<sup>2</sup>*

## ПОРУШЕННЯ ГУМОРАЛЬНОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ В ПЕРІОД ПІЗНІХ ПРОЯВІВ ПОЛІТРАВМИ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ТІОТРИАЗОЛІНОМ

<sup>1</sup>ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського",

<sup>2</sup>ДП "Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України", м. Одеса

**Резюме.** Політравма в періоді пізніх проявів травматичної хвороби супроводжується вираженими порушеннями гуморального імунітету, які проявляються збільшенням вмісту в сироватці крові циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) та імуноглобулінів класів А, М, G на 14-28-му доби експерименту. Застосування тіотриазоліну супроводжується меншим напруженням

гуморального імунітету, що супроводжувалося статистично достовірно нижчим вмістом у сироватці крові ЦІК, Ig A, M, G стосовно нелікованих тварин у всі терміни спостереження.

**Ключові слова:** політравма, гуморальний імунітет, тіотриазолін.

**Вступ.** Синдром поліорганної недостатності – типове ускладнення тяжкої механічної травми та травматичної хвороби (ТХ). В основі його розвитку лежить порушення кровотоку в мікроциркуляторному руслі з розвитком системної гіпоксії, у результаті чого відбувається активація цитокінової продукції клітинами моноцитарно-макрофагальної системи. Це, у свою чергу, призводить до значних порушень в імунній системі, в основному її пригнічення, наслідком чого стає розвиток нозокоміальних інфекцій [2].

Період пізніх проявів політравми (після 14 діб з моменту травми) характеризується активацією репаративних і відновних процесів. У цей період також реалізуються наслідки інфекційних ускладнень [3]. Однак особливості реагування

гуморальної ланки імунітету у відповідь на експериментальну політравму в період пізніх проявів ТХ вивчені недостатньо. Немає даних щодо корекції імунної відповіді тіотриазоліном – поліфункціональним препаратом, здатним нівелювати ряд патогенних механізмів, притаманних тяжкій травмі, у тому числі й порушення імунітету [8]. В умовах політравми доведений його позитивний ефект у період ранніх проявів політравми [4].

**Мета роботи.** З'ясувати особливості порушень гуморальної ланки імунітету в період пізніх проявів політравми та ефективність його корекції тіотриазоліном.

**Матеріал і методи.** В експериментах використано 54 нелінійних білих шурів-самців масою 200-220 г, які утримувалися в стандартних умо-