

ФОРМУВАННЯ КАПІЛЯРОПОДІБНИХ СТРУКТУР СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ І ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ В ПРОЦЕСІ КУЛЬТИВУВАННЯ

Ю.О. Петренко¹, Д.Б. Домбровський², Р.В. Салютін², О.Ю. Петренко^{1, 3}

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

² Інститут хірургії і трансплантології ім. О.О.Шалімова АМН України, Київ

³ ГП МНЦ кріобіології і кріомедицини НАН, АМН і МОЗ України, Харків

Реферат

Мезенхімальні стромальні (стовбурові) клітини (МСК) в даний час знаходять усе більш широке використання в регенеративній медицині, трансплантології і тканинній інженерії. Це обумовлено їх здібністю до самопідтримки, наявності високої проліфераційної активності і мультилінійного диференційного потенціалу. МСК можуть бути отримані з різних тканин плодів і дорослої людини. У роботі наведено порівняльне вивчення здатності МСК, отриманих з фетальної печінки і жирової тканини дорослої людини, до утворення капіляроподібних структур при культивуванні в середовищах, що індукують ендотелієне диференціювання. В умовах культивування, направлено на селективну експансію МСК, клітини, що ізольовані з двох джерел, демонстрували клонотенне зростання і утворювали однорідні моноверстви фібробластоподібних клітин. Після експансії стромальні клітини жирової тканини і фетальної печінки культивували в середовищах, що індукують ендотелієне диференціювання. У процесі культивування клітини, отримані з обох джерел, демонстрували зміну морфології і утворювали капіляроподібні структури. Отримані результати свідчать про те, що стромальні клітини, що виділені з печінки плодів і жирової тканини дорослої людини, можуть знайти вживання в розробці методів лікування хворих на судину патологію.

Ключові слова: стромальні клітини, жирова тканина, фетальна печінка, ендотелієне диференціювання

Abstract

CAPILLARY STRUCTURE FORMATION BY CULTIVATED HUMAN STROMAL STEM CELLS FROM FATTY TISSUE AND FETAL LIVER

Yu. O. PETRENKO¹, D. B. DOMBROVSKY²,

R. V. SALYUTIN², O. Yu. PETRENKO^{1, 3}

¹ Institute of problems of cryobiology and cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkiv;

² Institute of surgery and transplantology the name of O.O. Shalimov AMS Ukraine, Kyiv;

³ GP of MNTS of cryobiology and cryomedicine NAS, AMS and MOH of Ukraine, Kharkiv.

Mesenchymal stromal stem cells (MSCs) are becoming increasingly used in regenerative medicine, transplantation, and tissue engineering. This is due to their supportive capacity, their high proliferative activity, and their potential to develop into different cell lines. MSCs can be obtained from many sources.

The ability of MSCs obtained from foetal liver and fatty tissue of an adult male to form capillary structures when cultivated in environments that induce endothelial differentiation was studied. Under the cultivation conditions directed at selective expansion of MSCs, the cells that were isolated from the two sources demonstrated clonogenic growth and formed a homogeneous monolayer of fibroblast cells. After that, expansion of the stromal cells of fatty tissue and foetal liver when cultivated in environments that induce endothelial differentiation was studied. During cultivation, the cells obtained from both sources demonstrated morphological changes and formed capillary structures. The results obtained demonstrate that stromal tissue obtained from foetal liver and adult fatty tissue can be used in the development of treatments for patients with vascular pathology.

Key words: stromal cells, fatty tissue, foetal liver, endothelial differentiation

Вступ

На сьогодні мезенхімальні стромальні (стовбурові) клітини (МСК) розглядаються як перспективний клітинний матеріал для реконструкційної медицини, оскільки, володіючи здатністю диференціюватися в різні клітини мезодермального походження, вони можуть замінювати пошкоджені або неактивні клітини пацієнта. Ортодоксальними напрямками диференціювання МСК вважаються остеогенез, адіпогенез і хондроогенез. Проте, у низці праць показано їх здатність диференціюватися в ендотеліїні клітини [3, 4, 7-10, 12, 13, 15]. Однак, характерним морфофункціональним показником ефективності ендотелієного диференціювання є здатність ендотелієних клітин-попередників утворювати капіляроподібні структури на екстраклітинному матриксі в культурі. Такий напрям диференційного потенціалу МСК відкриває перспективи лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок, яка є серйозною проблемою ангіології і судинної хірургії. Хронічна ішемія кінцівок характеризується важкою наростаючою течією і обумовлена дегенераційно-некротичними і проліфераційними змінами клітин судинної стінки. Слід вважати, що отримання попередників ендотелієних клітин,

що володіють високим проліфераційним потенціалом, з МСК пацієнта може стати основою для розробки методів лікування ішемічного ураження, що засновано на замісній терапії кровоносних судин.

МСК присутні в багатьох органах і тканинах організму - кістковому мозку, шкірі, жировій, кістковій, м'язовій тканинах та інших. Фетальні тканини також містять МСК, причому завдяки онтогенетичним особливостям ці клітини характеризуються вищим проліфераційним, а, можливо, і диференційним потенціалом, в порівнянні з дорослими. У даній роботі показана можливість і описані деякі особливості формування капілярноподібних структур при ендотеліальному диференціюванні стромальних клітин фетальної печінки і жирової тканини дорослої людини *in vitro*.

Матеріал і методи

Експерименти проводили згідно нормам біомедичної етики з письмової згоди проінформованих донорів. Жирову тканину, що отримана в результаті хірургічного видалення жирових відкладень (ліпоаспірації), подрібнювали і піддавали ферментній обробці колагеназою. Стромальні клітини виділяли як описано нами раніше [1].

Фетальну печінку дезагрегували з використанням неферментного методу [10], модифікованого для малих об'ємів, після чого, отриману суспензію клітин фільтрували.

Клітини з наведених тканин культивували в живильному середовищі альфа-МЕМ, що була доповнена ембріональною сироваткою великої рогатої худоби (ЕС), 2 мМ L-глутаміну, 50 ед/мл Пеніциліну і 50 мг/мл стрептоміцину при 37°C, 5% CO2 і більше 90% вологості. Заміну живильного середовища проводили через 24 год. Клітини культивували протягом трьох-чотирьох пасажів із зміною середовища 2 рази на тиждень.

Імунофенотипічний аналіз субкультури проводили на 4 пасажі. Для цього суспензію культивованих клітин трипсинізували за стандартним методом, забарвлювали моноклональними антитілами CD29-PE, CD45-PE, CD105-FITC (Serotec), CD34 Class II-FITC, CD38-RPE (DAKO, Голландія), CD44-FITC, CD73-PE (BD Biosciences) згідно інструкціям виробників, двічі відмивали центрифугуванням при 200g протягом 10 хв в розчині Хенкса і аналізували на проточному цитометрі FACS Calibur (BD Biosciences, США).

Ендотелієне диференціювання проводили при моноверстовому культивуванні клітинної субкультури, взятої на 4-м пасажі, в середовищі EGM-2 (Endothelial Growth Medium - 2, Lonza, Бельгія) протягом 14 діб (рис. 1).

Здатність культивованих клітин утворювати капілярноподібні структури оцінювали на 7 і 14 добу культивування в індукуючому середовищі (рис. 1) із використанням екстраклітинного матриксу Матрігель (BD Biosciences, UK). Для

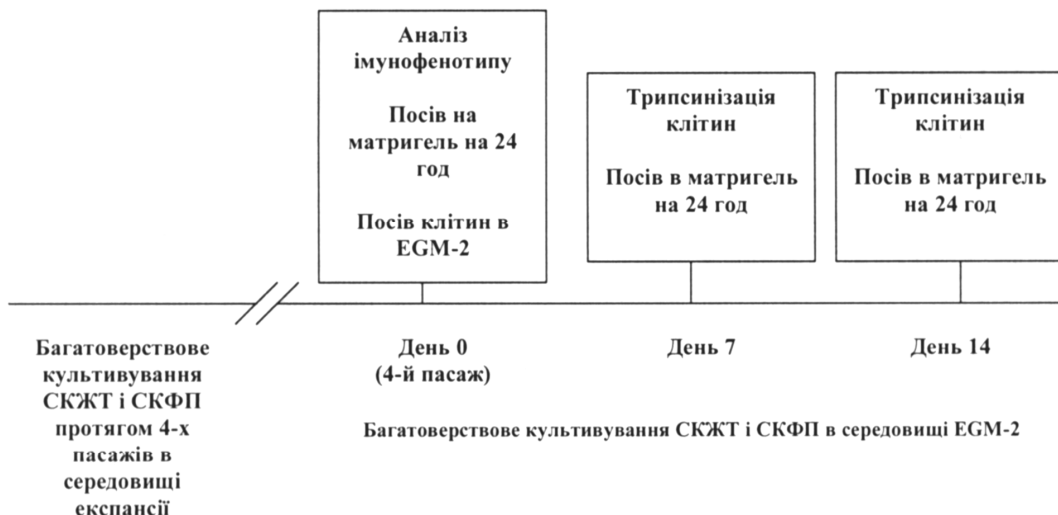


Рис. 1
Схема проведення експериментів

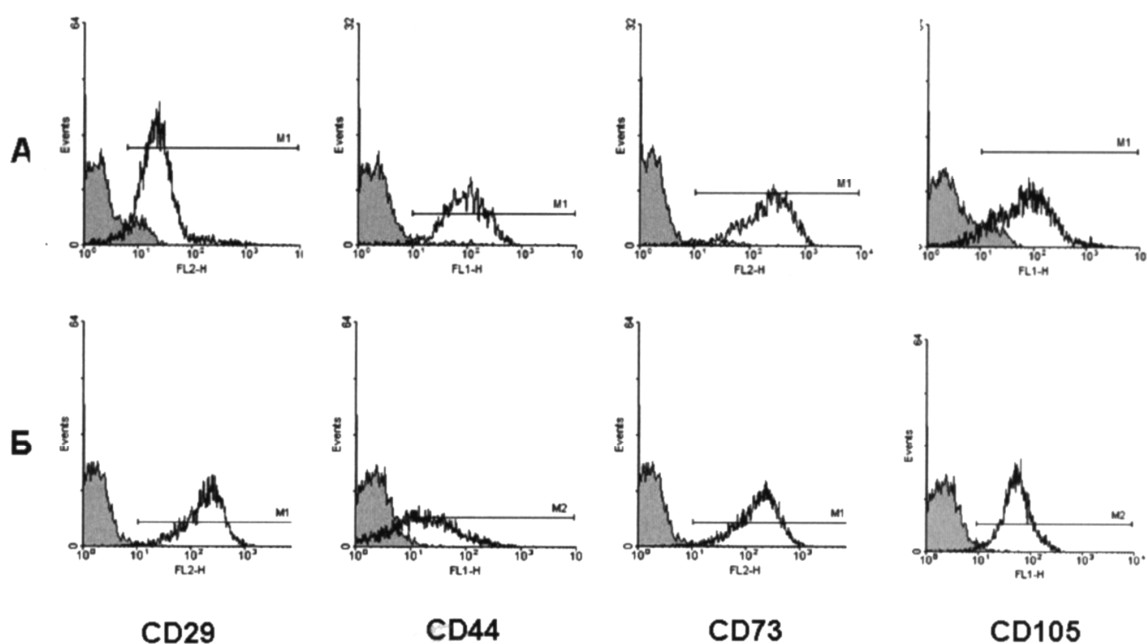


Рис. 2

Результати проточної цитофлуориметрії стромальних клітин жирової тканини (А) і фетальної печінки (Б) людини

цього заздалегідь охолоджений Матрігель вносили по 100 мкл у 96-лунковий планшет і залишали на 30-40 хв. при 37°C. Потім на поверхню матриксу наносили 100 мкл суспензії клітин в концентрації 105 клітин/мл і культивували протягом 24 год в середовищі EGM-2. Аналіз проводили під світловим інвертованим мікроскопом Сеті (Бельгія).

Результати й обговорення

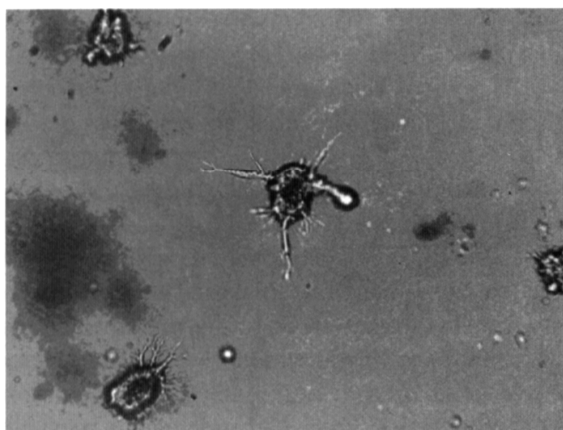
Свіжовиділені суспензії стромальних клітин жирової тканини (СКЖТ) і стромальних клітин фетальної печінки (СКФП) були гетерогенними і містили домішок гемопоетичних клітин, які елімінувались в ході субкультивування. У процесі культивування в середовищах, що забезпечують експансію стромальних клітин, гетерогенність вихідної суспензії знижувалася, і після 3-4 пасажів культури були представлені гомогенною популяцією фібробластоподібних клітин. Досягаючи конfluентної моноверстви клітини набували переважно веретеноподібної форми, що характерна для фібробластів, із формуванням типових клітинних "потоків".

Відомо, що одним із основних критеріїв імунофенотипічної оцінки клітинного складу є експресія специфічних поверхневих маркерів.

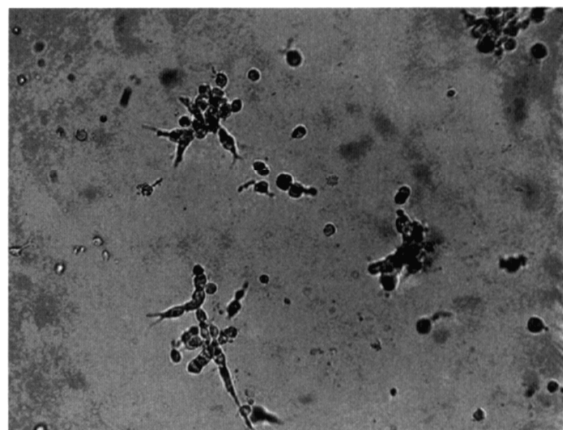
Фібробластоподібні клітини із жирової тканини і фетальної печінки людини (рис. 2) протягом 4 пасажів характеризувалися наступним імунофенотипом: CD29+, CD44+, CD73+, CD105+. Водночас, не спостерігалася експресія гемопоетичних маркерів CD34-, CD45- (дані не представлено). Цей фенотип був описаний раніше для МСК із інших джерел [6].

Таким чином, серія послідовних етапів очищення первинної суспензії клітин жирової тканини і фетальної печінки у поєднанні з культивуванням в адекватних для стромальних клітин умовах дозволяє отримати морфологічно практично однорідні культури, що характеризуються високим вмістом клітин із імунофенотипом МСК.

Функціональною ознакою вступу МСК в ендотелійне диференціювання вважають здібність до утворення капілярподібних структур при культивуванні на Матрігелі - матриці базальних мембран, екстрагованим із саркоми миші і запропонованого рядом авторів для оцінки ендотелійного потенціалу МСК [3, 4, 9, 10, 13]. Розташування на 24 год в Матрігель СКЖТ і СКФП, після проведення 4 пасажів моноверстового культивування в середовищі експансії, дозволило спостерігати наступну картину:



А



Б

Рис. 3

Морфологія СКЖТ (А) і СКФП (Б) 4-го пасажу після 24 годин культивування в Матрігелі (збільшення $\times 100$)

СКЖТ утворювали агрегати, форма яких була ближче до сферичної, на зовнішній поверхні цих агрегатів спостерігалися короткі променеподібні "відростки" (рис. 3 А).

При культивуванні СКФП людини клітинні елементи зберігали округлу форму і не проявляли здібності до утворення сферичних структур. Проте, клітини, ймовірно, за рахунок міграції, утворювали структури типу ланцюжків і нещільно упакованих скупчень (рис. 3 Б). Поодинокі клітинні елементи демонстрували тенденцію до набуття веретеноподібної форми. Разом з тим, видно, що в наведених умовах стромальні клітини, які виділені як з жирової тканини, так і з фетальної печінки формували клітинні агрегати, із яких, в деяких випадках, витягувалися короткі капілярноподібні відростки.

У подальшому виконували пасаж МСК із вказаних джерел з переводом їх в середовище EGM-2 і утриманням у даних умовах протягом 7 діб зі зміною середовища кожні 3 дні. Щільна мономерства, що утворилася, складалася із малозмінених фібробластоподібних клітин. Після трипсинізації цієї мономерства частину клітин переносили на Матрігель, а останні пересівали на пластик у середовищі EGM-2 для подальшого культивування (рис. 1).

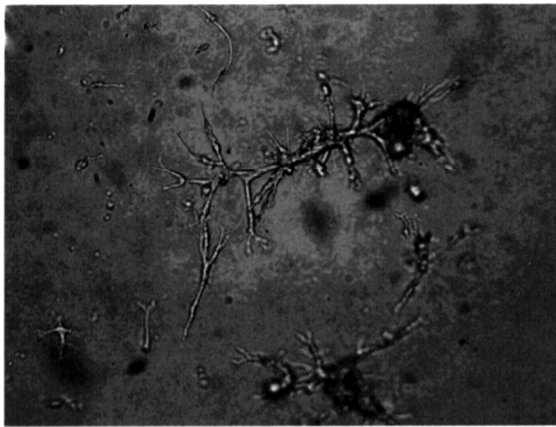
У результаті, СКЖТ, що знаходилися в мономерстві 7 діб під дією індукуючого середовища, протягом 24 годин культивування в Матрігелі, окрім здатності адгезуватися один із одним з утворенням клітинних сфероїдів, формували дендритоподібні структури різної товщини

і протяжності. Аналогічна картина була отримана в роботах [3, 4, 9, 10, 13] і оцінена як капілярноподібна (рис. 4 А).

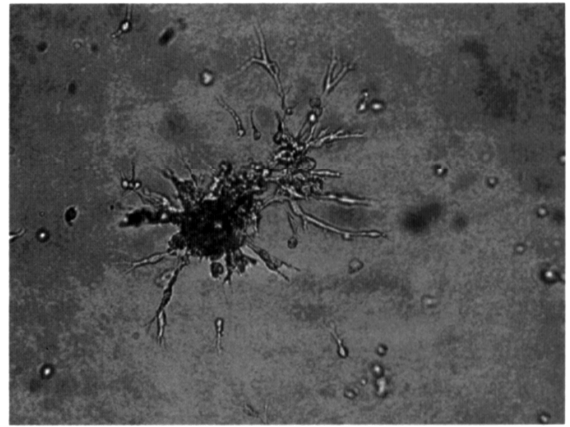
Клітини фетальної печінки формували схожі капілярноподібні структури, проте для них відмічено переважання формування клітинних агрегатів, із яких вишикувалися капілярноподібні структури невеликої довжини (рис. 4 Б).

Отже, у випадку СКЖТ (рис. 4 А) і СКФП (рис. 4 Б) клітини витягувалися, з'єднувалися між собою і формували гіллясті утворення, що нагадують капілярну мережу. Проте не всі клітини витягувалися - частина із них залишалася в округлому стані. Слід зазначити, що в разі культивування СКЖТ формування капілярних структур проходило швидше і інтенсивніше, ніж клітинами фетальної печінки (рис. 4 А). У випадку СКФП переважало формування клітинних агрегатів, із яких вишикувалися капілярноподібні структури (рис. 4 Б).

Через 14 діб мономерствового культивування в ендотелійному середовищі стромальні клітини формували типову щільну мономерству фібробластоподібних клітин, що практично не відрізняються залежно від джерела МСК. Після трипсинізації, 105 клітин/мл розташовували в Матрігелі на 24 години. При цьому спостерігали вибудовування клітинних елементів в сітчасту структуру (рис. 5 А). Клітинні елементи були орієнтовані в просторі Матрігелю у вигляді клітинних тяжів і рихлих скупчень (вузлів), характерних для капілярноподібних структур, що отримані *in vitro* [3, 4, 9, 10, 13]. У товщі Матрігелю



А



Б

Рис. 4

Формування капілярноподібних структур СКЖТ (А) і СКФП (Б) в Матрігелі після 7 днів культивування в середовищі EGM-2 (збільшення $\times 100$)

спостерігалася певна кількість вільних, не включених в об'ємну структуру, клітин.

Подібна картина була відмічена при спостереженні стану СКФП, що культивуються в аналогічних умовах (рис. 5 Б). Водночас, звертає на себе увагу менший, у порівнянні зі СКЖТ, розвиток об'ємних капілярноподібних структур в товщі Матрігелю.

При гострому ураженні судинного ендотелію, його реконструкція може відбуватися завдяки міграції довколишніх ендотеліальних клітин. Водночас, зрілі ендотеліальні клітини є остаточно диференційованими з низькою проліфераційною активністю, тому відновний процес пошкодженого ендотелію може бути утрудненим. В якості альтернативи ендотеліальним клітинам особливий інтерес представляють МСК.

У низці праць показано їх високу проліфераційну активність і мультилінійний диференційний потенціал. На сьогодні кістковий мозок є основним джерелом МСК. Показано, що МСК кісткового мозку можуть бути диференційовані в ендотеліальному напрямку [4, 10]. Водночас, отримання кісткового мозку є болючою та непростою для пацієнта процедурою, а проліфераційна активність і диференційний потенціал МСК кісткового мозку знижується із віком [14]. У зв'язку з цим, пошук альтернативних джерел МСК, що володіють наявністю ендотеліального потенціалу є актуальним завданням.

У низці робіт показано можливість направленого ендотеліального диференціювання МСК, що виділені з кордової крові [7], пуповинного канатика [4], амніотичної рідини [15] і жи-

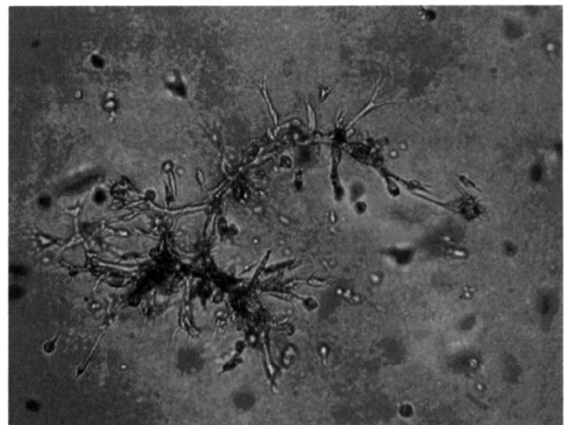
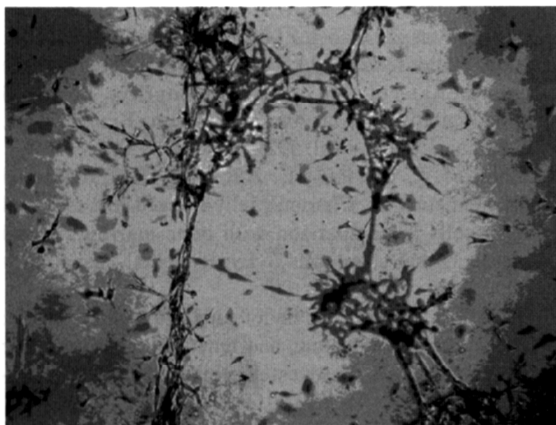


Рис. 5

Формування капілярноподібних структур СКЖТ (А) і СКФП (Б) в Матрігелі після 14 днів культивування в середовищі EGM-2 (збільшення $\times 100$)

рової тканини дорослої людини [3, 12] у присутності VEGF, EGF і гідрокортизону. За рахунок відносної легкості і малої інвазивності процедури отримання жирової тканини, її використання як джерело МСК відкриває великі перспективи в напрямку лікування хворих на серцево-судинну патологію. Водночас, відсутні дані про ендотелієне диференціювання МСК, що виділені з фетальних тканин людини. Фетальна печінка першого триместру гестації є основним органом кровотворення і містить цілу низку стовбурих клітин (гемопоетичних, мезенхімальних, гепатичних та ін.), що свідчить про унікальність цього джерела. У роботах, наведених в нашій лабораторії раніше, було показано, що і СКЖТ і СКФП людини володіють здатністю до колонієутворення, а також наявністю адипогенного і остеогенного диференційного потенціалу [1, 2].

У цій праці проведено порівняльну оцінку здатності стромальних клітин, що виділені з жирової тканини дорослої людини і фетальної печінки, утворювати капілярноподібні структури на різних етапах направленої *in vitro* диференціювання при культивуванні в позаклітинному матриксі. Позаклітинний матрикс не лише сприяє адгезії, міграції і проліферації ендотелієних клітин, але також забезпечує необхідні умови для формування капілярного морфогенезу, його стабільності і дозрівання [5]. Показано, що не індуковані СКЖТ і СКФП 4-го пасажу, які володіють схожим імунофенотипом, володіли слабкою здатністю утворювати капілярноподібні структури, що вочевидь пов'язано з недостатнім часом перебування клітин в середовищі індукції (24 години). Крім того, ці дані підтверджують відсутність в досліджуваній суспензії диференційованих ендотелієних клітин. Надалі клітини індукували протягом 7 і 14 діб моноверстового культивування в середовищі EGM-2, що містить чинники росту FGF, EGF, VEGF. На 7-у і 14-у добу індукції клітини трипсинували і знову розташовували в Матрігелі на 24 години. У результаті спостерігали наявність капіляротворюючої активності в стромальних клітинах з обох досліджених джерел. Слід зазначити, що СКЖТ характеризувалися швидшою і інтенсивнішою здібністю до формування капілярноподібних структур, в порівнянні з клітинами фетальної печінки.

Висновок

Таким чином, в роботі показаний потенціал стромальних клітин жирової тканини і фетальної печінки людини до формування капілярноподібних структур *in vitro* у відповідь на чинники, що індукують ендотелієне диференціювання. Доведено, що не індуковані клітини 4-го пасажу володіють надзвичайно низькою капіляротворюючою здатністю. Індукція клітин в ендотелієному напрямку протягом 14 діб призводить до вибудовування клітинних елементів в сітчасту тривимірну структуру в товщі Матрігелю, що свідчить про наявність у клітин ендотелієних властивостей. Стромальні клітини фетальної печінки володіють меншою, в порівнянні зі СКЖТ, здатністю формувати капілярноподібні структури. Наведені дані свідчать про здатність стромальних клітин жирової тканини і фетальної печінки людини вступати в ендотелієне диференціювання і перспективність їх використання в регенераційній медицині для лікування хворих на серцево-судинну патологію.

Література

1. Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г., Жуликов О.А., Правдюк А.И. Мазур С.П., Горохова Н.А., Гришук В.П., Волкова Н.А., Грищенко В.И. Выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства стромальных клеток-предшественников, выделенных из жировой ткани при монослойном культивировании // Журнал АМН України . - 2008. - Т. 14, №2. - С. 354-365.
2. Скоробогатова Н.Г., Волкова Н.А., Петренко А.Ю. Остеогенные и адипогенные свойства фибробластоподобных клеток-предшественников фетальной печени человека. - Цитология. - 2008. - Том 50, №4. - С. 317-322.
3. Cao Y., Sun Z., Liao L., Meng Y., Han Q., Zhao R.C. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization *in vivo* // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2005. - Vol. 332. - P. 370-379.
4. Chen M.Y., Lie P.C., Li Z.L., Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Experimental Hematology 2009. - Vol. 37. - P. 629-640.
5. Davis G.E., Senger D.R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. // Circ. Res. - 2005. - Vol. 97. - P. 1093-1105.
6. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. - 2006. - Vol. 8, № 4. - P. 315-317.

7. Gang, E.J., Jeong, J.A., Han, S., Yan, Q., Jeon, C.J., Kim, H. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells // *Cytherapy*. - 2006. - Vol. 8. - P. 215-223.
8. Kim S., Von Recum H. Endothelial Stem Cells and Precursors for Tissue Engineering: Cell Source, Differentiation, Selection, and Application // *Tissue engineering*. - 2008. - Vol. 14, № 1. - P. 133-147.
9. Liu J.W., Dunoyer-Geindre S., Serre-Beinier V., Mai G., Lambert J.F., Fish R.J., Pernod G., Buehler L., Bounameaux H., Kruithof E.K.O. Characterization of endothelial cells derived from human mesenchymal stem cells // *Journal of thrombosis and haemostasis*. - 2007. - Vol. 5. - P. 826-834.
10. Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhauser M., Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro // *Stem cells*. - 2004. - Vol. 22. - P. 377-384.
11. Petrenko A.Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochem.* - 1991. - Vol. 194, № 2. - P. 325-329.
12. Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B., Andre M., Nibbelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Pe'nicaud L., Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives // *Circulation*. - 2004. - Vol. 109. - P. 656-668.
13. Rouwkema J., Westerweel P.E., de Boer J., Verhaar M.C., van Blitterswijk C.A. The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering // *Tissue engineering. Part A*. - 2009. - Vol. 15. - P. 247-259.
14. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells // *Bone*. - 2003. - Vol. 33. - P. 919-926.
15. Zhang P., Baxter J., Vinod K., Tulenko T.N., Di Muzio P.J. Endothelial Differentiation of Amniotic Fluid-Derived Stem Cells: Synergism of Biochemical and Shear Force Stimuli // *Stem cells and development*. - 2009. - Vol. 18, № 9. - P. 1299-1308.