

УДК 576.371:612.397:611.36.013:57.085.23

Ю. О. Петренко¹
Р. В. Салютін²
Д. Б. Домбровський²
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

ФОРМУВАННЯ КАПІЛЯРОПОДІБНИХ СТРУКТУР У ПРОЦЕСІ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОГО ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ

Ключові слова: стромальні клітини, фетальна печінка, ендотеліальне диференціювання.

Резюме. Була досліджена можливість та особливості формування капіляроподібних структур при ендотеліальному диференціюванні стовбурових клітин фетальної печінки *in vitro*.

В умовах культивування, направлено на селективну експансію, стовбурові клітини фетальної печінки демонстрували клоногенне зростання і утворювали однорідні моношари фібробластоподібних клітин. Після експансії стромальні клітини фетальної печінки культивували в середовищах, що індують ендотеліальне диференціювання. В ході культивування клітини, демонстрували зміну морфології і утворювали капіляроподібні структури.

Вступ

Проблема лікування хворих з облітеруючими та оклюзійними ураженнями дистального (термінального) артеріального русла є однією з складних та невіршених проблем сучасної судинної хірургії. Неєфективність або неможливість виконання операцій «прямої» ревазуляризації на ураженому дистальному артеріальному сегменті обумовлює розробку нових та удосконалення існуючих методів «непрямої» ревазуляризації [1,2].

У науковій літературі широко обговорюється ефективність застосування методів терапевтичного ангіогенезу для лікування цієї тяжкої категорії хворих. На сьогодні використовують різні методи стимуляції процесів ангіогенезу, в тому числі за рахунок трансплантації стовбурових клітин кісткового мозку [3].

Однак клінічне використання кісткового мозку як джерела мезенхімальних стовбурових клітин проблематичне, оскільки процедура його отримання достатньо складна, і в результаті вдається зібрати малу кількість клітин [4].

Більш високі потенції до стимуляції процесів ангіогенезу мають стромальні стовбурові клітини жирової тканини та мультипотентні стовбурові клітини фетальної печінки (СКФП) 6-8 тижнів гестації, які експресують CD 34+, CD 38-, CD 45Ra^{low}, CD 71^{low}, обумовлюючи як високий потенціал трансдиференціювання до ангіобластів та ендотеліоцитів – основної складової капіляру так і теоретичне підґрунтя щодо застосування з метою стимуляції ангіогенезу за умов ішемії клітинних культур ембріонального походження [5].

При цьому характерним морфо-функціональним показником ефективності ендотеліального диференціювання є здатність ендотеліальних клітин-попе-

редників утворювати капіляроподібні структури на екстраклітинному матриці в культурі.

Так як в деяких попередніх наукових роботах нами були висвітлені особливості диференціювання стромальних клітин жирової тканини, то метою подальшого експерименту було дослідити можливість та особливості формування капіляроподібних структур при ендотеліальному диференціюванні стовбурових клітин фетальної печінки *in vitro*.

Матеріал і методи

Експерименти проводили згідно нормам біомедичної етики. Фетальну печінку абортівних ембріонів 6-8 тижнів гестації дезагрегували з використанням неферментативного методу [6], модифікованого для малих об'ємів, після чого, отриману суспензію клітин фільтрували.

Отримані клітини 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.

Іммунофенотипічний аналіз субкультури проводили на 4 пасажі. Для цього суспензію культивованих клітин трипсінізували за стандартною методикою, 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 ро-

зчині Хенкса і аналізували на проточному цитометрі FACS Calibur (BD Biosciences, США).

Ендотеліальне диференціювання проводили при моношаровому культивуванні клітинної субкультури, взятої на 4-му пасажі, в середовищі EGM-2 (Endothelial Growth Medium – 2, Lonza, Бельгія) протягом 14 днів (рис. 1).

Здатність культивованих клітин утворювати капілярноподібні структури оцінювали на 7 і 14 добу культивування в індукуючому середовищі (рис. 1) із використанням екстраклітинного матриксу Матригель (BD Biosciences, UK). Для цього заздалегідь охолоджений Матригель вносили по 100 мкл в 96-лунковий планшет і залишали на 30-40 хвилин 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).

Обговорення результатів дослідження

Свіжовиділені суспензії стромальних клітин фетальної печінки були гетерогенними і містили домішок гемопоетичних клітин, які елімінувалися 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 практично гомогенною популяцією фібробластоподібних клітин.

Досягаючи конфлуентного моношару клітини набували переважно веретеноподібної форми, що характерна для фібробластів, з формуванням типових клітинних «потоків».

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

Фібробластоподібні клітини фетальної печінки людини протягом 4 пасажів характеризувалися наступним імунофенотипом: CD29+, CD44+, CD73+, CD105+ (рис. 2). У той же час, не спостерігалася експресія гемопоетичних маркерів CD34-, CD45- (дані не представлені).

Таким чином, серія послідовних етапів очищення первинної суспензії клітин фетальної печінки у поєднанні з культивуванням в адекватних для стромальних клітин умовах дозволяє отримати морфологічно практично однорідні культури, що характеризуються високим вмістом клітин з імуно-

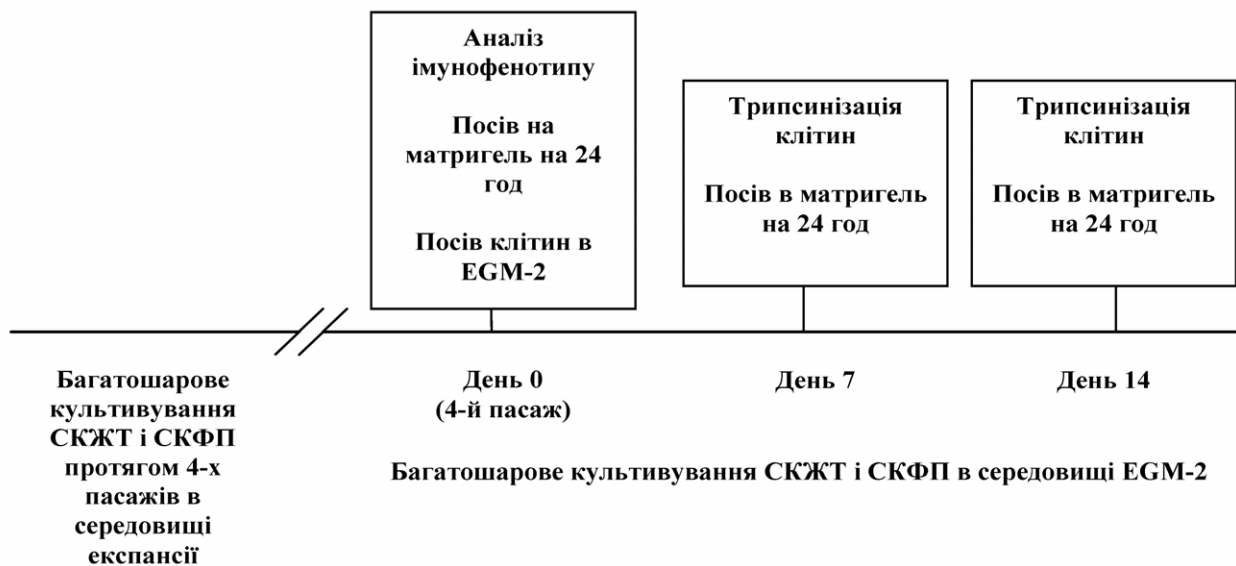


Рис. 1. Схема проведення експериментів.

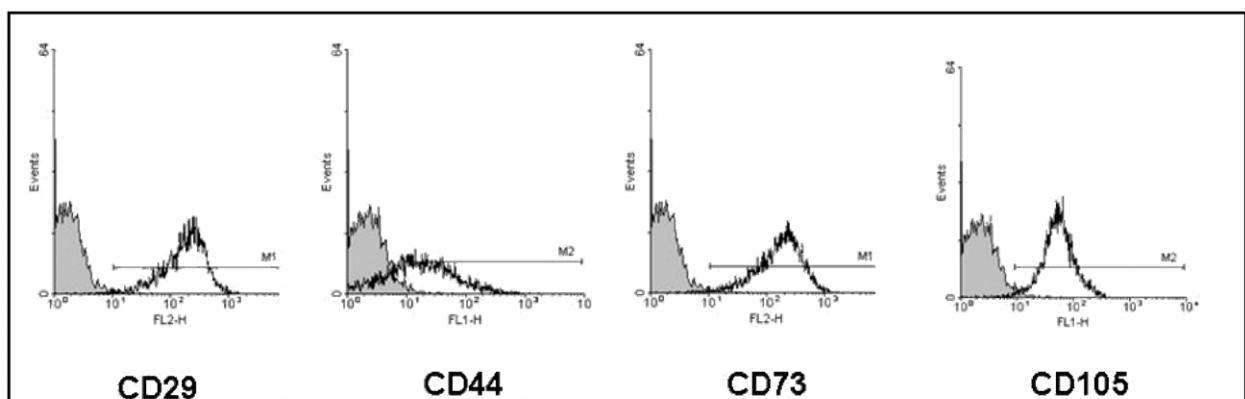


Рис. 2. Результати проточної цитофлуориметрії стромальних клітин фетальної печінки людини.

фенотипом мезенхімальних стовбурових клітин (МСК).

Функціональною ознакою вступу МСК в ендотеліальне диференціювання вважають здібність до утворення капілярноподібних структур при культивуванні на Матрігелі – матриксі базальних мембран, екстрагованим із саркоми миші і запропонованого рядом авторів для оцінки ендотеліального потенціалу МСК [6, 7, 8, 9, 10].

Розташування на 24 год в Матрігелі клітини фетальної печінки, після проведення 4 пасажів моношарового культивування в середовищі експансії, дозволило спостерігати наступну картину: 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). Поодинокі клітинні елементи демонстрували тенденцію до набуття веретеноподібної форми.

Окрім того, в приведених умовах стромальні клітини, виділені з фетальної печінки формували клітинні агрегати, з яких витягувалися короткі капілярноподібні відростки. У подальшому виконували пасаж МСК з фетальної печінки, з переводом їх в середовище EGM-2 і утриманням у даних умовах протягом 7 діб зі зміною середовища кожні 3 дні.

Щільний моношар, що утворився, складався з малозмінених фібробластоподібних клітин. Після трипсинізації цього моношару частину клітин переносили на Матрігелі, а останні пересівали на пластик у середовищі EGM-2 для подальшого культивування (рис. 1).

У результаті, СКФП, що знаходилися в моношарі 7 діб під дією індукуючого середовища, протягом 24 годин культивування в Матрігелі, адгезувалися та утворювали клітинні агрегати, з яких вишикувалися капілярноподібні структури невеликої довжини (рис. 4). Видно, СКФП витягувалися, з'єднувалися між собою і формували гіллясті утворення, що нагадують капілярну мережу. Проте не всі клітини витягувалися – частина з них залишалася в округлому стані.

Через 14 діб моношарового культивування в ендотеліальному середовищі стромальні клітини формували типовий щільний моношар фібробластоподібних клітин. Після трипсинізації, 105 клітин/мл розташовували в Матрігелі на 24 години. При цьому спостерігали вибудовування клітинних елементів у сітчасту структуру (рис. 5). Клітинні елементи були орієнтовані в просторі Матрігелю у вигляді клітинних тяжів і рихлих скупчень (вузлів), характерних для капілярноподібних структур, що отримані *in vitro* [6,7,8,9,10].

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



Рис. 3. Морфологія СКФП 4-го пасажу після 24 годин культивування в Матрігелі (збільшення X100).



Рис. 4. Формування капілярноподібних структур СКФП в Матрігелі після 7 діб культивування в середовищі EGM-2 (збільшення X100).



Рис. 5. Формування капілярноподібних структур СКФП в Матрігелі після 14 діб культивування в середовищі EGM-2 (збільшення X100).

У раніш виконаних експериментальних роботах, було показано, що СКФП людини володіють здатністю до колонієутворення, а також наявністю адипогенного і остеогенного диференційовального потенціалу [11]. Результати даного експериментального дослідження свідчать про здатність

стромальних клітин, що виділені з фетальної печінки, утворювати капілярноподібні структури на різних етапах направлено *in vitro* диференціювання, при культивуванні в позаклітинному матриксі.

Показано, що не індуковані СКФП 4-го пасажу, володіли слабкою здатністю утворювати капілярноподібні структури, що вочевидь пов'язано з недостатнім часом перебування клітин в середовищі індукції (24 години). Позаклітинний матрикс не лише сприяє адгезії, міграції і проліферації ендотеліальних клітин, але також забезпечує необхідні умови для формування капілярного морфогенезу, його стабільності і дозрівання [12].

Крім того, ці дані підтверджують відсутність в досліджуваній суспензії диференційованих ендотеліальних клітин.

Висновки

Таким чином, стромальні клітини фетальної печінки людини мають значний потенціал до формування капілярноподібних структур *in vitro* у відповідь на чинники, що індують ендотеліальне диференціювання.

Доведено, що не індуковані клітини 4-го пасажу володіють надзвичайно низькою капіляротворюючою здатністю. Індукція клітин в ендотеліальному напрямку протягом 14 діб призводить до вибудовування клітинних елементів в сітчасту тривимірну структуру в товщі Матрігелю, що свідчить про наявність у клітин ендотеліальних властивостей.

Наведені дані свідчать про здатність стромальних клітин фетальної печінки людини вступати в ендотеліальне диференціювання і перспективність їх використання в регенеративній медицині для лікування хворих на серцево-судинну патологію.

Перспективи подальших досліджень

Перспективним є подальше вивчення можливостей стромальних клітин фетальної печінки вступати в ендотеліальне диференціювання.

Література. 1. *Albers M.* Meta-analysis of popliteal-to-distal vein bypass grafts for critical ischemia / [M. Albers, M. Romiti, F.C. Brochado-Neto et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2006. – Vol. 43. №3. – P.498-503. 2. *Lai J.P.* Pernes J.M. Imaging of the lower limb arteries: when, how and why? / [J.P. Lai, J.M. Pernes] // *J. Radiol.* – 2004. – Vol. 85. – P.845-850. 3. *Delp M.D.* Structural and functional remodeling of skeletal muscle microvasculature is induced by simulated microgravity / [M.D. Delp, P.N. Colleran, M.K. Wilkerson et al.] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 5№4 - P.278-299. 4. *Stenderup K.* Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells / K. Stenderup, J. Justesen, C. Clausen, M. Kassem // *Bone.* – 2003. – Vol. 33. – P. 919-926. 5. *Кухарчук А.Л.* Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / А.Л. Кухарчук, В.В. Радченко, В.М. Сирман. – Черновцы: Золоті литаври, 2004. – 505с. 6. *Oswald J.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro / [J. Oswald, S. Boxberger, B. Jorgensen et al.] // *Stem cells.* – 2004. – Vol. 22. – P. 377-384. 7. *Cao Y.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo / [Y. Cao, Z. Sun, L. Liao et al.] //

Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 332. – P. 370–379. 8. *Chen M.Y.* Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells / [M.Y. Chen, P.C. Lie, Z.L. Li et al.] // *Experimental Hematology* 2009. – Vol. 37. – P. 629–640. 9. *Liu J.W.* Characterization of endothelial cells derived from human mesenchymal stem cells / [J.W. Liu, S. Dunoyer-Geindre, V. Serre-Beinier] // *Journal of thrombosis and haemostasis.* – 2007. – Vol. 5. – P. 826-834. 10. *Rouwkema J.* The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering / [J. Rouwkema, P.E. Westerweel, J. de Boer] // *Tissue engineering. Part A.* – 2009. – Vol. 15. – P. 247-259. 11. *Davis G.E.* Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization / G.E. Davis, D.R. Senger // *Circ. Res.* – 2005. – Vol. 97. – P. 1093-1105. 12. *Скоробогатова Н.Г.* Остеогенные и адипогенные свойства фибробластоподобных клеток-предшественников фетальной печени человека / Н.Г. Скоробогатова, Н.А. Волкова, А.Ю. Петренко - *Цитология.* – 2008. – Том 50, №4. – С. 317-322.

ФОРМИРОВАНИЕ КАПИЛЛЯРОПОДОБНЫХ СТРУКТУР В ПРОЦЕССЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

*Ю. О. Петренко, Р. В. Салютин,
Д. Б. Домбровський, О. Ю. Петренко*

Резюме. Была изучена возможность и особенности формирования капиллярноподобных структур при эндотелиальной дифференцировке стволовых клеток фетальной печени *in vitro*. В условиях культивации, направленной на селективную экспансию, стволовые клетки фетальной печени демонстрировали колониальное разрастание и образовывали однородный монослой фибробластоподобных клеток. После экспансии стволовые клетки фетальной печени культивировали в средах, которые индуцируют эндотелиальную дифференцировку. В ходе культивации клетки демонстрировали смену морфологии и образовывали капиллярноподобные структуры.

Ключевые слова: стромальные клетки, фетальная печень, эндотелиальная дифференцировка.

FORMING OF CAPILLARY STRUCTURES IN THE PROCESS OF ENDOTHELIAL DIFFERENTIATION OF STEM CELLS OF FETAL LIVER

*Yu. O. Petrenko, D. B. Dombrowsky,
R. V. Salyutin, O. Yu. Petrenko*

Abstract. The possibility and features of forming of capillary structures at the endothelial differentiation of stem cells of fetal liver of *in vitro* was investigated. In the conditions of cultivating, directed on selective expansion, the stem cells of fetal liver demonstrated clonogenic excrescence and formed homogeneous monolayer of fibroblast cells. After expansion the stem cells of fetal liver were cultivated in environments which induce an endothelial differentiation. During cultivating cells demonstrated changing morphologists and formed capillary structures.

Key words: stromal cells, fetal liver, endothelial differentiation.

**Institute problems of cryobiology and cryomedicine NAS of Ukraine (Kharkiv)
Institute of surgery and transplantology name
O.O. Shalimov AMS Ukraine (Kyiv)
GP MNTS cryobiology and cryomedicine NAS, AMS and
MOH of Ukraine (Kharkiv)**

Clin. and experim. pathol. - 2010. - Vol.9, №2 (32). - P.74-77.

Надійшла до редакції 25.05.2010

Рецензент – доц. І. Ф. Курченко

© Ю. О. Петренко, Р. В. Салютин, Д. Б. Домбровський,
О. Ю. Петренко, 2010