

Ю. О. Петренко¹, Р. В. Салютін², Н. В. Рєпін¹, О. Ю. Петренко¹

ІДЕНТИФІКАЦІЯ КЛІТИН ЕНДОТЕЛІАЛЬНОГО ПАРОСТКА В КУЛЬТУРІ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків,²Національний інститут хірургії та трансплантології НАМН України, Київ

Вступ

Хронічна ішемія кінцівок, зумовлена ураженням дистального судинного русла, що не підлягає реконструкції, характеризується тяжким і прогресивним перебігом, який часто призводить до соціальної та трудової дезінтеграції хворого [1].

Сьогодні все частіше в комплексному лікуванні даної категорії хворих застосовують методи терапевтичного ангіогенезу, у тому числі ті, що ґрунтуються на використанні аутологічних клітин кісткового мозку [2].

Однак клінічне використання кісткового мозку як джерела мезенхімальних стовбурових клітин проблематичне, оскільки процедура його отримання інвазивна та доволі складна, а в результаті вдається отримати недостатню кількість функціонально активних клітин. Таким чином, виникає питання пошуку альтернативних джерел ендотеліальних клітин-попередників.

Привертає увагу великий та унікальний потенціал фетальної печінки, яка містить значний спектр стовбурових клітин і клітин-попередників різних паростків, які мають низьку імуногенність, що дозволяє їх використовувати без попереднього HLA-типівання [3]. Крім гепатичних і гемопоетичних клітин, фетальна печінка містить клітини ендотеліального та мезенхімального паростків [4; 5].

Ендотеліальні клітини суттєво впливають на процеси кровотворення, які відбуваються у фетальній печінці, оскільки секретують IL-1, фактор некрозу пухлин (tumor necrosis

factor — TNF- α) та колонієстимулювальний фактор гранулоцитів і макрофагів (GM-CSF) [6; 7]. Нині для ідентифікації й оцінки ендотеліальних клітин використовують низку маркерів, серед яких найбільш демонстративними є FLT-1, FLK-1, CD31 (PECAM), Sca1, фактор фон Віллебранда (von Willebrand's factor) [8; 9]. Одним із найбільш показових і ранніх маркерів ендотеліальних клітин-попередників є FLK-1 (fetal liver kinase-1), який є рецептором фактора росту судинного ендотелію (VEGF), що відповідає за проліферацію та диференціювання ендотеліальних клітин [10; 11].

Метою даного дослідження є спроба ідентифікувати ендотеліальні клітини-попередники у фетальній печінці людини 8–10 тиж. гестації з використанням методу електронної мікроскопії, визначення експресії FLK-1 та здатності культури клітин фетальної печінки до формування капілярноподібної сітки в позаклітинному матриксі за умов *in vitro*.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження проводили згідно з нормами біомедичної етики, з письмової згоди поінформованих донорів фетального матеріалу, на базі кафедри біохімії Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків) (завідувач кафедри — проф. О. Ю. Петренко).

Для отримання суспензії клітин фетальної печінки останню дезагрегували з використанням неферментативного

методу, модифікованого для малих об'ємів, після чого отриману суспензію клітин фільтрували [12].

Отримані клітини культивували у живильному середовищі альфа-MEM, доповненому ембріональною сироваткою великої рогатої худоби (ЕС), 2 мМ L-глутаміну, 50 од/мл пеніциліну і 50 мг/мл стрептомицину при 37 °С, 5 % CO₂ і більше 90 % вологості. Заміну живильного середовища проводили через 24 год. Клітини культивували протягом 3–4 пасяжів зі зміною середовища двічі на тиждень. Для оцінки морфології клітин клітинну культуру фіксували 70%-м етанолом протягом 30 хв, після чого забарвлювали розчином азур-еозину, розведеного 1:10 дистильованою водою (протягом 10 хв). Після триразового промивання дистильованою водою препарати досліджували під світловим інвертованим мікроскопом «Сеті» (Бельгія).

Здатність культивованих клітин утворювати капілярноподібні структури оцінювали на 7-му та 14-ту добу культивування в індукуючому середовищі з використанням екстраклітинного матриксу Матригель (BD Biosciences, UK). Для цього заздалегідь охолоджений Матригель вносили по 100 мкл у 96-лунковий планшет і залишали на 30–40 хв при 37 °С. Потім на поверхню матриксу наносили 100 мкл суспензії клітин у концентрації 105 клітин/мл і культивували протягом 24 год у середовищі EGM-2. Аналіз проводили під світловим інвертованим мікроскопом «Сеті» (Бельгія).



Для визначення можливості експресії клітинами фетальної печінки маркера ендотеліальних клітин FLK-1 клітинна культура фіксувалася 4%-м параформальдегідом протягом 30 хв при температурі 4 °С. Після триразового відмивання клітин фосфатним буфером проводили блокування неспецифічного зв'язування 5%-го БСА, який був виготовлений на основі фосфатного буфера протягом 30 хв. Потім клітини інкубували з первинними поліклональними антитілами *gab-bit-anti-human FLK-1* (1:75) протягом 1 год за умов кімнатної температури.

Надалі, після триразового відмивання фосфатним буфером, клітини інкубували з вторинними *goat-anti-rabbit* антитілами, кон'югованими *Alexa-Fluor 488* нм протягом 40 хв при кімнатній температурі та у темряві. Після інкубування та триразового відмивання фосфатним буфером проводили дозобарвлення клітин 4',6-diamidino-2-phenylindole (*DAPI*, 100 нг/мл) протягом 5 хв. Забарвлені клітинні культури досліджували за допомогою флуоресцентної мікроскопії під інвертованим флуоресцентним мікроскопом *Ceti Inverso EPIFluor* (UK).

Для проведення електронно-мікроскопічного дослідження тканини фетальної печінки (6–8 тиж. гестації) її фрагменти фіксували в 2%-му розчині глутарового альдегіду, який був виготовлений на фосфатному буфері (рН 7,4) при температурі 0–4 °С протягом 2 год. Надалі матеріал промивали у фосфатному буфері та фіксували в 1%-му розчині чотириокису осмію на фосфатному буфері протягом 1 год. Після фіксації зразки промивали фосфатним буфером, зневоднювали ацетоном із поступовим збільшенням концентрації останнього (схема проведення: 50, 70, 85, 96 % — по 10 хв і в 100%-му ацетоні — двічі по 10 хв) і просочували сумішшю епотон-аралдиту. Потім зразки вміщували в поліетиленові ампули, що містили заливну смолу, та полімеризу-

вали протягом 24 год при температурі 60 °С. Ультратонкі зрізи контрастували насиченим водним розчином уранілацетату і розчином цитрату свинцю за Рейнольдсом.

Ультраструктуру клітин печінки досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К (при пришвидшувальному напруженні 75 кВ), який був оснащений системою зняття й аналізу зображення *CAI-01A* (АТ "SELMI", Суми) на основі *CCD* камери *DX-2* і пакета програм фірми "KAPPA" (Німеччина).

Результати дослідження та їх обговорення

Результати морфологічного дослідження тканини фетальної печінки свідчили про значну гетерогенність клітинного складу фетальної печінки людини 8–10 тиж. гестації (рис. 1).

У досліджуваних зразках переважно фіксували наяв-

ність клітин гемопоетичного та гепатичного паростків. Однак зразки тканини фетальної печінки в значній кількості містили клітини ендотеліального ряду, які формували синусоїдальні капіляри.

Після дезагрегації тканини фетальної печінки отриману клітинну суспензію ресуспендували на живильному середовищі, яке містило 15%-ну ембріональну сироватку великої рогатої худоби, та поміщали в умови моношарового культивування. Через 48–72 год після посіву культури фіксували на дні культурального флакона наявність гетерогенної популяції клітин, що адгезували, які мали різну морфологію.

Виявляли клітини епітеліальної морфології (представники печінкового паростка), які в процесі культивування (на 5-ту добу) утворювали щільні центри та ділянки росту (рис. 2).

Рис. 1. Структура фетальної печінки людини 8–10 тиж. гестації з типовим клітинним складом: ПЕ — проеритробласт; Ек — ендотеліальна клітина; Еп та Еб — еритроblastи різного ступеня зрілості; Г — гепатичні клітини

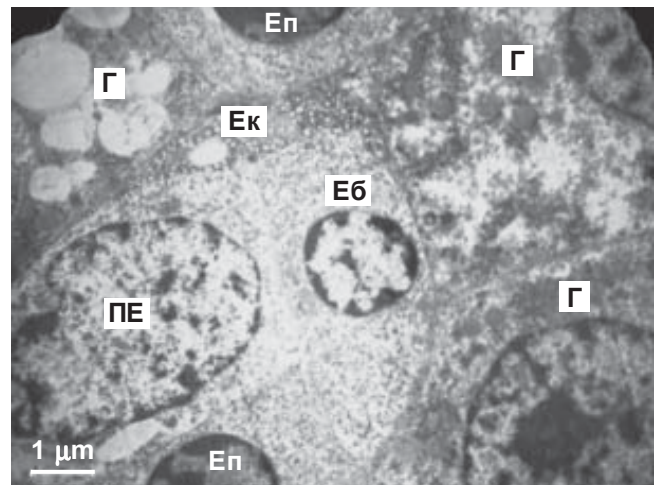
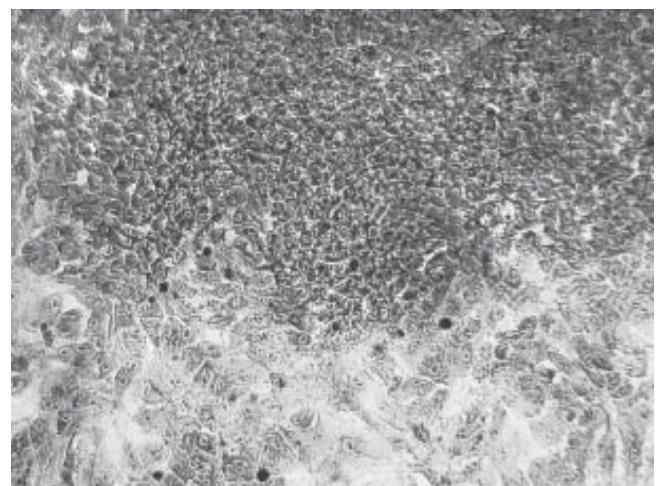


Рис. 2. Морфологічні особливості первинної культури адгезивних клітин фетальної печінки людини на 5-ту добу культивування (× 40)



На периферії ділянок росту були наявні клітини фібро-бластоподібної морфології, а також овальні та багатокутні клітини, зі значною кількістю відростків, які вірогідно мали макрофагальну природу.

При мікроскопічному дослідженні клітини з явними ознаками ендотеліальних попередників виявити не вдалося, що зумовило проведення подальших досліджень, метою яких було визначення клітин ендотеліального паростка за допомогою імуноцитохімічних тестів — специфічного маркера ендотеліальних клітин FLK-1 і функціонального методу оцінки здатності клітин до капіляроутворення *in vitro* в позаклітинному матриксі.

Проведені дослідження з культивування суспензії клітин фетальної печінки у позаклітинному матриксі за умов *in vitro* свідчили про їхню здатність до формування капілярних трубочок.

Клітини, ймовірно, за рахунок міграції утворювали структури типу ланцюжків і нецільно упакованих скупчень, а поодинокі клітинні елементи демонстрували тенденцію до набуття веретеноподібної форми. На 7-му добу експерименту спостерігали формування клітинних агрегатів, з яких витягувалися короткі капіляроподібні відростки.

Надалі капілярні відростки з'єднувалися між собою та формували гіллясті утворення, що нагадували капілярну сітку. Проте не всі клітини витягувалися — частина з них залишалася в округлому стані (рис. 3).

Паралельно на 5-ту добу культивування досліджували експресію адгезивними клітинами фетальної печінки людини маркера ендотеліальних клітин FLK-1.

Результати проведеного імуноцитохімічного дослідження вказували на те, що частина клітин культури фетальної печінки позитивно забарвлювалася на FLK-1, тобто належала до клітин ендотеліального паростка (рис. 4). Експресія клітинами FLK-1 проявлялась

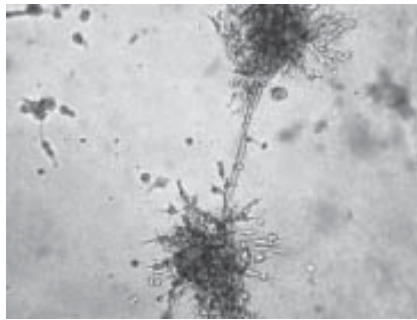


Рис. 3. Формування капіляроподібних структур первинної суспензії клітин фетальної печінки у «Матригелі» після 14 днів культивування у середовищі EGM-2 (× 100)

у вигляді дещо гранульованого забарвлення, концентрованого поблизу ядра, а в деяких випадках — і по всій поверхні клітини.

Висновки

Таким чином, первинна суспензія клітин фетальної печінки людини містить клітини ендотеліального паростка, здатні до експресії маркера ендотелію FLK-1 і формування капіляроподібних структур за умов *in vitro*.

Враховуючи ендотеліальний потенціал клітин фетальної печінки, вважаємо перспективним їх використання в комплексному лікуванні хворих із ураженнями термінального судинного русла кінцівок, що не підлягають реконструкції, та з іншою патологією, супроводжуваною ішемічним синдромом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Wasiak K. Surgical results of leg amputation according to Ghormley's technique in the treatment of chronic lower limb ischaemia / K. Wasiak, P. M. Paczkowski, J. M. Garlicki // *Acta Chir. Belg.* — 2006. — N 106 (1). — P. 52–56.
2. Baumgartner I. Lessons learned from human gene therapy in patients with chronic critical limb ischemia / I. Baumgartner // *J. Invasive Cardiol.* — 2001. — Vol. 13, N 4. — P. 330–332.
3. Петренко Ю. А. Иммунорегуляторные свойства клеток фетальной печени человека / Ю. А. Петренко // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* — 2007. — Т. 2, № 3. — С. 57–61.
4. Broudy V. Tumor necrosis factor type alpha stimulates human endothelial cell to produce granulocyte/

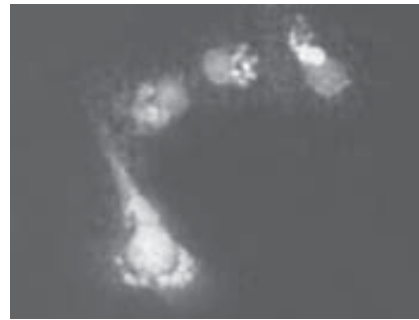


Рис. 4. Експресія адгезивними клітинами фетальної печінки людини маркера ендотеліальних клітин FLK-1, ядра забарвлені DAPI (× 200)

macrophage colony-stimulating factor / V. Broudy, K. Kaushansky, G. Segal // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1986. — Vol. 83, N 19. — P. 7467–7471.

5. Sieff C. Interleukin 1 induces cultured human endothelial cell production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor / C. Sieff, S. Tsai, D. Faller // *J. Clin. Invest.* — 1987. — Vol. 79, N 1. — P. 48–51.

6. Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver / S. Cherqui, S. M. Kurian, O. Schussler [et al.] // *Stem cells.* — 2006. — Vol. 24. — P. 44–54.

7. Kim S. Endothelial Stem Cells and Precursors for Tissue Engineering: Cell Source, Differentiation, Selection, and Application / S. Kim, H. von Recum // *Tissue engineering. Part B.* — 2008. — Vol. 14, N 1. — P. 133–147.

8. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion / O. M. Martínez-Estrada, Y. Mucoz-Santosa, J. Julveb [et al.] // *Cardiovascular Research.* — 2005. — Vol. 65. — P. 328–333.

9. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors / J. Yamashita, H. Itoh, M. Hirashima [et al.] // *Nature.* — 2000. — Vol. 408. — P. 92–96.

10. 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, X. Wei // *Experimental Hematology.* — 2009. — Vol. 37. — P. 629–640.

11. Characterization of endothelial cells derived from human mesenchymal stem cells / J. W. Liu, S. Dunoier-Geindre, V. Serre-Beinier [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis.* — 2007. — Vol. 5. — P. 826–834.

12. Petrenko A. Yu. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration / A. Yu. Petrenko, A. N. Sukach // *Analytical Biochem.* — 1991. — Vol. 194, N 2. — P. 325–329.

