

УДК 612.35:616.36-092.4

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ

Петренко Ю.О.¹, Салютін Р.В.², Репін Н.В.¹, Петренко О.Ю.¹

¹ Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (Харків).

² Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України, Київ

Проведено експериментальне дослідження з метою визначення та ідентифікації ендотеліальних клітин - попередників в суспензії фетальної печінки людини 8-10 тижнів гестації. З застосуванням морфологічних, електронно-мікроскопічних, імуноцитохімічних методів та культивування в позаклітинному матриксі за умов *in vitro* доведено що: первинна суспензія клітин фетальної печінки людини містить клітини ендотеліального паростку, які здатні до експресії маркера ендотелію FLK-1 та формування капілярноподібних структур за умов *in vitro*. Вбачається перспективним дослідження їх використання клітинної культури фетальної печінки в комплексному лікуванні патологічних станів що супроводжуються ішемічним синдромом (хронічна ішемія, тощо).

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

Вступ

Хронічна ішемія кінцівок, що зумовлена ураженням дистального судинного русла, характеризується тяжким і прогресивним перебігом та приводить до соціальної і трудової дезінтеграції хворого [1]. В науковій літературі обговорюється ефективність застосування методів клітинно-тканинної терапії в комплексному хірургічному лікуванні ранового процесу у хворих з судинними порушеннями [1, 2].

В основі впливу клітинної терапії на процеси регенерації тканини лежить синтез клітинами факторів росту, цитокінів і молекул позаклітинного матриксу, які в зоні пошкодження вступають у взаємодію з трансплантатом і клітинами ранового ложа. Внаслідок подібної взаємодії клітини синтезують широкий спектр регуляторних молекул, необхідний у конкретній ситуації, причому необхідної кількості [1].

У клініках і лабораторіях широко досліджуються джерела клітинних трансплантатів. Проаналізувавши характер росту

клітин в культурі та оцінивши їх функціональну активність, дослідники переконалися у більших проліферативних можливостях клітин ембріональної печінки і кордової крові порівняно з кістковим мозком, що може бути пов'язане з гетерогенністю стовбурових клітин - попередників. Кордова кров містить стовбурові клітини попередники (CD 34+), значно більше некомпітованих гемопоетичних клітин в порівнянні з дорослим кістковим мозком. Окрім того, у них високий проліферативний потенціал та менша імуногенність. Кровотворні клітини зважені у плазмі кордової крові, яка, в свою чергу, містить компоненти репродуктивних імуномодуляторів, спектр гормонів, ростові фактори, вітаміни, мікроелементи [3, 4].

Звертає на себе увагу значний та унікальний потенціал фетальної печінки що містить значний спектр стовбурових клітин та клітин-попередників різних паростків, які мають низьку імуногенність, що дозволяє їх використовувати без попереднього HLA-типуювання [3]. Наряду з гепатичними і гемопоетичними клітинами, фетальна печін-

ки містить клітини ендотеліального та мезенхімального паростків [4, 5].

На теперішній час для ідентифікації та оцінки ендотеліальних клітин використовують ряд маркерів, серед яких найбільш демонстративними є FLT-1 і FLK-1 CD31 (PECAM), Sca1, фактор Вон Виллебрандта (vonWillebrandt factor) [8,9]. Одним з найбільш показовим та раннім маркером 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 [6, 7].

Мета даної роботи полягає в дослідженні ендотеліальних клітин – попередників в фетальній печінці людини 8-10 тижнів гестації, визначення експресії FLK-1 та здатності клітин фетальної печінки до формування капілярноподібної мережі в позаклітинному матриксі, за умов *in vitro*.

Матеріали та методи дослідження

Роботи проводились з додержанням законодавчо-нормативних вимог, на базі кафедри біохімії Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків), завідувач кафедри, професор Петренко О.Ю.

Для отримання суспензії клітин фетальної печінки останню дезагрегували з використанням неферментативного методу, модифікованого для малих об'ємів, після чого, отриману суспензію клітин фільтрували [8].

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. Для оцінки морфології клітин, клітинну культуру фіксували 70% етанолом, на протязі 30 хвилин, після чого забарвлювали розчином азур-еозину, розведеного 1:10 дистильованою водою, продовж 10 хвилин. Після трьох-

кратного промивання дистильованою водою, препарати досліджували під світловим інвертованим мікроскопом «Сеті» (Бельгія).

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

З метою визначення можливості експресії клітинами фетальної печінки маркера ендотеліальних клітин FLK-1 клітинна культура фіксувалась 4% параформальдегідом на протязі 30 хвилин при температурі 4 °С. Після трьохразового відмивання клітин фосфатним буфером, проводили блокування неспецифічного зв'язування 5% БСА, який був виготовлений на основі фосфатного буфера на протязі 30 хвилин. Потім клітини інкубували з первинними поліклональними антитілами rabbit-anti-human FLK-1 (1:75), на протязі 1 години за умов кімнатної температури.

Надалі, після трьохкратного відмивання фосфатним буфером, клітини інкубували з вторинними goat-anti-rabbit антитілами, кон'югованими AlexaFluor 488 nm протягом 40 хвилин при кімнатній температурі та темряві. Після інкубування та трьохкратного відмивання фосфатним буфером, проводили дофарбування клітин 4',6 - diamidino-2-phenylindole (DAPI, 100 ng/ml) протягом 5 хвилин. Пофарбовані 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 тижнів гестації) її фрагменти фіксували в 2 % розчині глутарового альдегіду, який був виготовлений на фосфатно-

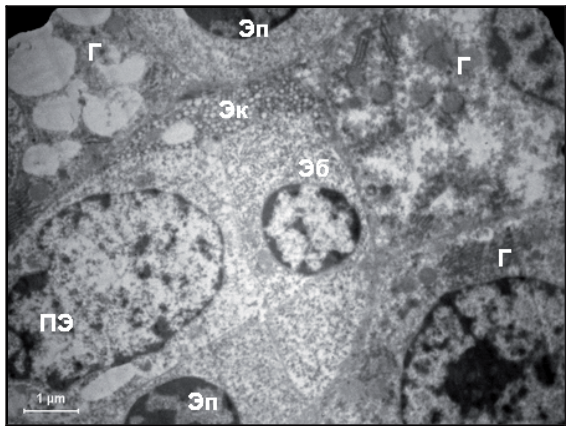


Рис. 1. Структура фетальної печінки людини 8-10 тижнів гестації з типовим клітинним складом: ПЕ – проеритробласт; Эк – ендотеліальна клітина; Эк та ЕП – еритробласти різного ступеню зрілості; Г – гепатині клітини

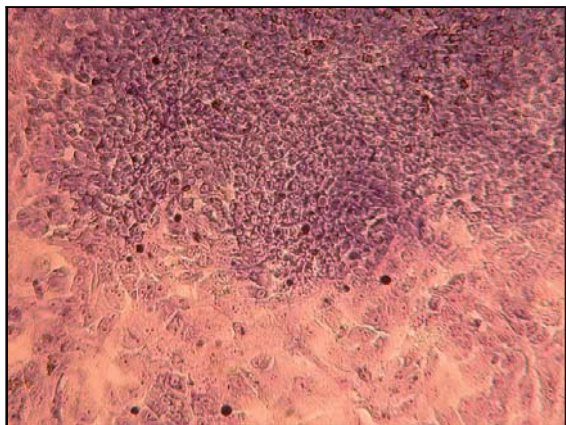


Рис. 2. Морфологічні особливості первинної культури адгезивних клітин фетальної печінки людини на 5 добу культивування (x 40)

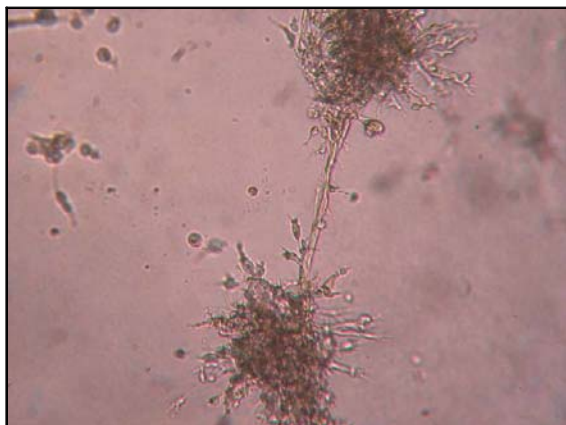


Рис. 3. Формування капілярподібних структур ПСКФП в «Матрігелі» після 14 діб культивування в середовищі EGM-2 (збільшення x100)

му буфері (рН 7,4) при температурі 0-4 °С на протязі 2 годин. Надалі матеріал промивали в фосфатному буфері і фіксували в 1% розчині чотирьохокису осмію на фосфатному буфері на протязі 1 години. Після фіксації

зразки промивали фосфатним буфером, зневоджували ацетоном з поступовим збільшенням концентрації останнього (схема проводки: 50%, 70%, 85%, 96% - по 10 хв. и в 100 % ацетоні – двічі по 10 хв.) та просочували сумішшю ептон-аралдит. Потім зразки поміщали в поліетиленові ампули, що містили заливну смолу та полімеризували на протязі 24 годин при температурі 60 °С. Ультратонкі зрізи контрастували насиченим водним розчином ураніл ацетату і розчином цитрату свинцю по Рейнольдсу. Ультраструктуру клітин печінки досліджували за допомогою електронного мікроскопу ПЭМ-125К (при прискорюючій напрузі 75 kV) який був оснащений системою зняття та аналізу зображення САИ - 01А (АО «SELMI», М. Суми) на основі CCD камери DX- 2 і пакету програм фірми «КАРРА» (Німеччина).

Результати та їх обговорення

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

В досліджуваних зразках переважно фіксували наявність клітин гемопоетичного та гепатичного ростків. Однак, зразки тканини фетальної печінки в значній кількості містили клітини ендотеліального ряду, які формували синусоїдальні капіляри.

Після дезагрегації тканини фетальної печінки, отриману клітинну суспензію резсуспензювали на поживному середовищі, яке містило 15% ембріональну сироватку великої рогатої худоби та поміщали в умови моношарового культивування. Через 48-72 години після посіву культури фіксували на дні культурального флакону наявність гетерогенної популяції адгезивних клітин, які мали різну морфологічну структуру.

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

На периферії ділянок росту були на-

явними клітини фібробластоподібної морфології, а також овальні і багатокутні клітини, з значною кількістю відростків та вірогідно мали макрофагальну природу.

При мікроскопічному дослідженні клітини з явними ознаками ендотеліальних попередників виявити не вдалося, що обумовило проведення подальших досліджень, метою яких було визначити клітини ендотеліального паростку за допомогою імуноцитохімічних тестів – специфічного маркеру ендотеліальних клітин FLK-1 та функціонального методу оцінки здатності клітин до капіляроутворення *in vitro* в позаклітинному матриксі.

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

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

Надалі капілярні відростки з'єднувалися між собою і формували гіллясті утворення, що нагадують капілярну мережу. Проте не всі клітини витягувалися – частина з них залишалася в округлому стані (рис.3.).

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

Результати проведеного імуноцитохімічного дослідження вказували на те що частина клітин культури фетальної печінки позитивно забарвлювалась на FLK-1, тобто належала до клітин ендотеліального паростку. Експресія клітинами FLK-1 проявлялась у вигляді злегка гранульованого забарвлення, концентрованого поблизу ядра, а в деяких випадках по всій поверхні клітини.

Висновки

Результати морфологічного дослідження тканини фетальної печінки людини 8-

10 тижнів гестації свідчили про гетерогенність їх клітинного складу, включаючи значну кількість клітини ендотеліального ряду, які формували синусоїдальні капіляри.

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

Клітини, ймовірно, за рахунок міграції, утворювали структури типу ланцюжків і нещільно упакованих скупчень, а поодинокі клітинні елементи демонстрували тенденцію до набуття веретеноподібної форми. На 7 добу експерименту формувались клітинні агрегати, з яких витягувалися короткі капіляроподібні відростки. Надалі капілярні відростки з'єднувалися між собою і формували гіллясті утворення, що нагадують капілярну мережу. Проте не всі клітини витягувалися – частина з них залишалася в округлому стані

Результати проведеного імуноцитохімічного дослідження вказували на те що частина клітин культури фетальної печінки належала до клітин ендотеліального паростку. Експресія клітинами FLK-1 проявлялась у вигляді злегка гранульованого забарвлення, концентрованого поблизу ядра, а в деяких випадках і по всій поверхні клітини.

Враховуючи ендотеліальний потенціал клітин фетальної печінки вбачається перспективним дослідження їх використання в комплексному лікуванні хворих ураженнями термінального судинного русла кінцівок та з іншою патологією що супроводжується ішемічним синдромом.

Література

1. Wasiak K, Paczkowski P.M, Garlicki J.M. Surgical results of leg amputation according to Ghormley's technique in the treatment of chronic lower limb ischaemia. // Acta Chir. Belg. – 2006. - №106(1). – P.52-56.
2. Kim S., Von Recum H. Endothelial Stem Cells and Precursors for Tissue Engineering: Cell Source, Differentiation, Selection, and Application Tissue engineering: Part B Volume 14, Number

- 1, 2008 133-147
3. Baumgartner I. Lessons learned from human gene therapy in patients with chronic critical limb ischemia // *J. Invasive Cardiol.* – 2001. – vol. 13, №4. – P. 330-332.
 4. Петренко Ю.А. Иммунорегуляторные свойства клеток фетальной печени человека // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2007. – Т. 2, №3. – С. 57-61
 5. Cherqui S., Kurian S.M., Schussler O., Hewel J.A., Yates III J.R., Salomon D.R. Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver // *Stem cells.* – 2006. – Vol. 24. – P.44-54
 6. 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;37:629-640
 7. 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, 5 826-834.
 8. Petrenko A.Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochem.* – 1991. – Vol. 194, № 2. – P. 325-329.

Резюме

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

*Петренко Ю.А., Салютин Р.В.,
Репин Н.В., Петренко А.Ю.*

Проведено экспериментальное исследование с целью выявления и идентификации эндотелиальных клеток – предшественников в суспензии фетальной печени человека 8-10 недель гестации. Используя морфологические, электронно-микроско-

пические, иммуноцитохимические методы и культивирование в внеклеточном матриксе, в условиях *in vitro* доказано: первичная суспензия клеток фетальной печени содержит клетки эндотелиального ростка, которые способны к экспрессии маркера эндотелия FLK-1 и формирования в условиях *in vitro* капилляроподобных структур.

Представляется перспективным исследование возможности использования клеточной культуры фетальной печени в комплексном лечении патологических состояний, которые сопровождаются ишемическим синдромом (хроническая ишемия, и т.д.).

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

Summary

EXPERIMENTAL RESEARCHES OF ENDOTHELIAL CELLS OF A FATAL LIVER OF THE PERSON

*Petrenko Yu.O., Salyutin R.V.,
Repin N.V., Petrenko O.Yu.*

An experimental study has been carried out aiming at determining and identifying endothelial cells - precursors in a suspension of human fetal liver of 8-10 gestation weeks. Using of morphological, electron microscopic, immunocytochemical methods and *in vitro* cultivation in the extracellular matrix we have proven the following: the primary suspension of human fetal liver cells contains endothelial line cells, which are capable to express the endothelial marker FLK-1 and to form capillary-like structures *in vitro*. The use of fetal liver cell cultures in treating pathological conditions accompanied by the ischemic syndrome (chronic ischemia, etc.) is considered a promising area of further studies.

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

*Впервые поступила в редакцию 17.02.2012 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*