УДК 576.371:612.397:611.36.013:57.085.23

Ю.О. Петренко[1], Д.Б. Домбровський[2], Р.В. Салютін[2], О.Ю. Петренко[1,3]

Ендотеліальне диференціювання стромальних клітин жирової тканини людини в процесі направленого культивування

[1] *Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків,*

[2] *Інститут хірургії і трансплантології ім. О.О. Шалімова АМН України, м. Київ,*

[3] *ГП МНЦ кріобіології і кріомедицини НАН, АМН і МОЗ України, м. Харків*

Ключові слова: *стромальні клітини, жирова тканина, ендотеліальне диференціювання.*

Мезенхімальні стромальні клітини нині знаходять усе більш широке використання в регенеративній медицині, трансплантології та тканинній інженерії. Це зумовлено їх здатністю до самопідтримки, високою проліферативною активністю й мультилінійного диференційного потенціалу. МСК можна бути отримати з різних тканин плодів і дорослої людини. У роботі наведено вивчення здатності МСК, отриманих з жирової тканини дорослої людини, до утворення капіляроподібних структур при культивуванні в середовищах, що індукують ендотеліальне диференціювання. В умовах культивування, спрямованого на селективну експансію МСК, ізольовані з даного джерела клітини виявляли клоногенне зростання й утворювали однорідні моношари фібробластоподібних клітин. Після експансії стромальні клітини жирової тканини культивували в середовищах, що індукують ендотеліальне диференціювання. В ході культивування клітини демонстрували зміну морфології й утворювали капіляроподібні структури. Отримані результати свідчать про те, що виділені з жирової тканини дорослої людини стромальні клітини можуть використовуватися в розробці методів лікування хворих на судинну патологію.

Эндотелиальное дифференцирование стромальних клеток жировой ткани человека в процессе направленного культивирования

Ю.А. Петренко, Д.Б. Домбровский, Р.В. Салютин, А.Ю. Петренко

Мезенхимальные стромальные клетки в настоящее время находят все более широкое использование в регенеративной медицине, трансплантологии и тканевой инженерии. Это обусловлено их способностью к самоподдержке, наличию высокой пролиферативной активности и мультилинейного дифференцировочного потенциала. МСК могут быть получены из разных тканей плодов и взрослого человека. В работе приведено изучение способности МСК, полученных из жировой ткани взрослого человека, к образованию капилляроподобных структур при культивировании в средах, которые индуцируют эндотелиальное дифференцирование. В условиях культивирования, направленного на селективную экспансию МСК, клетки, которые изолированы из данного источника, демонстрировали клоногенный рост и образовывали однородные монослои фибробластоподобных клеток. После экспансии стромальные клетки жировой ткани культивировали в средах, которые индуцируют эндотелиальное дифференцирование. В ходе культивирования клетки демонстрировали изменение морфологии и образовывали капилляроподобные структуры. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стромальные клетки, которые выделены из жировой ткани взрослого человека, могут найти применение в разработке методов лечения больных с сосудистой патологией.

Ключевые слова: *стромальные клетки, жировая ткань, эндотелиальное дифференцирование.*

Патология. – 2010. – Т.7., №2. – С. 69–73

Endothelial differentiation of fatty tissue stromal cells of man in the process of directed cultivation

Yu.O. Petrenko, D.B. Dombrovsky, R.V. Salyutin, O.Yu. Petrenko

Mesenhimal stromal cells presently find more wide use in regenerative medicine, transplantology and tissue engineering. It is conditioned by their capacity for support, to the presence of high proliferate activity and multilineage of differential potential. MSC can be derived from different tissues of fetus and adults. The comparative study of ability of MSC, got from a fatty tissue of human, to formate capillary-like structures at cultivation in media which induce endothelial differentiation is given in the article. In the conditions of cultivation, directed on selective expansion of MSC, cells, which are isolated out of that sources, demonstrated clonogenic growth and formed homogeneous monolayer of fibroblast cells. After expansion stromal cells of fatty tissue were cultivated in media which induce endothelial differentiation. During cultivation cells, got from those sources, demonstrated the change of morphology and formed capillary-like structures. Reseived results testify that stromal cells which are received from fatty tissue of adults can be used in development of treatment methods of patients with a vessel pathology.

Key words: *stromal cells, fatty tissue, endothelial differentiation.*

Pathologia. 2010; 7(2): 69–73

Мезенхімальні стромальні (стовбурові) клітини (МСК) розглядаються як перспективний клітинний матеріал для реконструктивної медицини, оскільки, маючи здатність диференціюватися в різні клітини мезодермального походження, вони можуть заміщати пошкоджені або неактивні клітини пацієнта. Ортодоксальними напрямами диференціювання МСК вважаються остегенез, адіпогенез і хондрогенез. Проте у ряді робіт показана їх здатність диференціюватися в ендотеліальні клітини [3,4,7–10,12,13]. При цьому, характерним морфофункціональним показником ефективності ендотеліального диференціювання є здатність ендотеліальних клітин-попередників утворювати капіляроподібні структури на екстраклітинному матриксі в культурі. Такий напрямок диференційного потенціалу МСК відкриває перспективи лікування

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

хворих на хронічну ішемію кінцівок, яка є серйозною проблемою ангіології та судинної хірургії. Хронічна ішемія кінцівок характеризується важкою прогресуючою течією і зумовлена дегенеративно-некротичними і проліферативними змінами клітин судинної стінки. Слід вважати, що отримання попередників ендотеліальних клітин, що мають високий проліферативний потенціал, з МСК пацієнта може стати основою для розробки методів лікування ішемічного ураження, що базується на замісній терапії кровоносних судин.

МСК наявні в багатьох органах і тканинах організму – кістковому мозку, шкірі, жировій, кістковій, м'язовій тканинах тощо.

Мета роботи

Показати можливість і описати деякі особливості формування капіляроподібних структур при ендотеліальному диференціюванні стромальних клітин жирової тканини дорослої людини in vitro.

Матеріали і методи дослідження

Експерименти проводили згідно норм біомедичної етики з письмової згоди проінформованих донорів. Жирову тканину, отриману в результаті хірургічного видалення жирових відкладень (ліпоаспірації), подрібнювали й піддавали ферментативній обробці коллагеназою. Стромальні клітини виділяли як описано нами раніше [1].

Клітини культивували в живильному середовищі альфа-МЕМ, що була доповнена ембріональною сироваткою великої рогатої худоби (ЕС), 2 мМ L-глутаміну, 50 ед/мл пеніциліну й 50 мг/мл стрептоміцину при 37°С, 5% CO_2 і більше 90% вологості. Заміну живильного середовища проводили через 24 год. Клітини культивували протягом трьох–чотирьох пасажів зі зміною середовища двічі на тиждень.

Імунофенотипічний аналіз субкультури проводили на четвертому пасажі. Для цього суспензію культивованих клітин трипсинізували 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) за інструкціями виробників, двічі відмивали центрифугуванням при 200 g протягом 10 хв у розчині 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 діб (*рис. 1*).

Здатність культивованих клітин утворювати капіляроподібні структури оцінювали на 7 і 14 добу культивування в індукуючому середовищі (*рис. 1*) з використанням екстраклітинного матриксу Матрігель (BD Biosciences, UK). Для цього заздалегідь охолоджений Матрігель вносили по 100 мкл в 96-лунковий планшет і залишали на 30–40 хв при 37°С. Потім на поверхню матриксу наносили 100 мкл суспензії клітин в концентрації 10^5 клітин/мл і культивували протягом 24 год в середовищі EGM-2. Аналіз проводили під світловим інвертованим мікроскопом Сеті (Бельгія).

Результати та їх обговорення

Свіжовиділені суспензії стромальних клітин жирової тканини (СКЖТ) були гетерогенними й містили домішок гемопоезних клітин, що елімінувались у ході субкультивування. Протягом процесу культивування в середовищах, що забезпечують експансію стромальних клітин, гетерогенність вихідної суспензії знижувалася, і після 3–4 пасажів культури були представлені майже гомогенною популяцією фібробластоподібних клітин. Досягаючи конфлуентного моношару клітини набували переважно веретеноподібної форми, характерної для фібробластів, з формуванням типових клітинних «потоків».

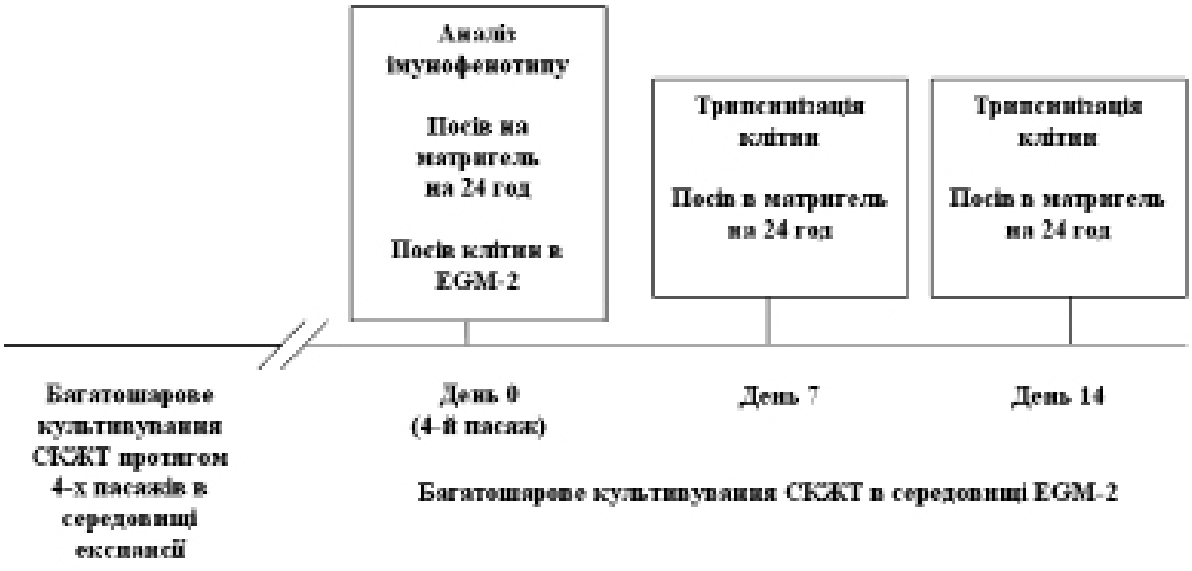

Рис. 1. Схема проведення експериментів.

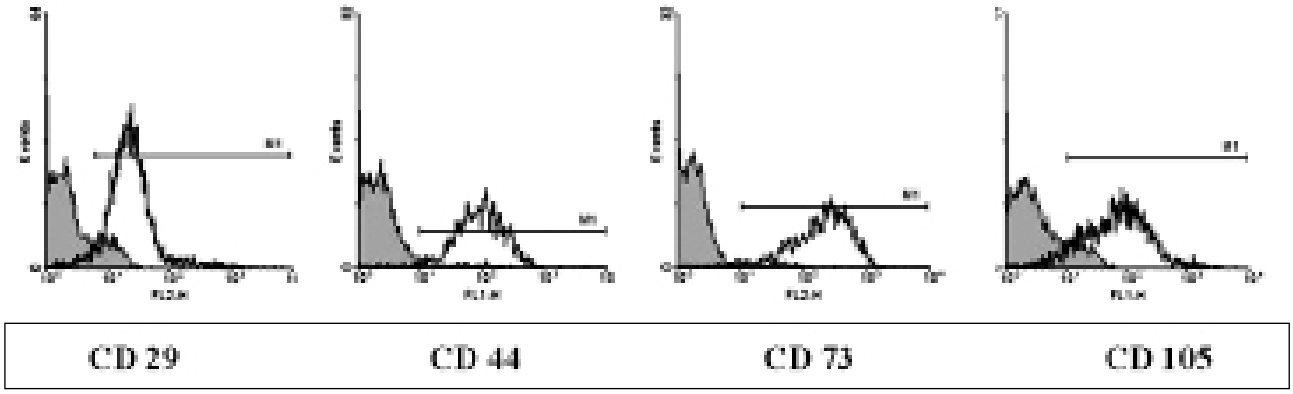

Рис. 2. Результати проточної цитофлуориметрії стромальних клітин жирової тканини людини.

Відомо, що одним із основних критеріїв імунофенотипічної оцінки клітинного складу є експресія специфічних поверхневих маркерів. Як видно з *рисунку 2*, фібробластоподібні клітини з жирової тканини протягом 4 пасажів характеризувалися наступним імунофенотипом: CD29+, CD44+, CD73+, CD105+. Однак, не спостережено експресію гемопоезних маркерів CD34-, CD45- (дані не представлені), наведені результати підтверджуються попередніми даними наукової літератури [6].

Отже, серія послідовних етапів очищення первинної суспензії клітин жирової тканини, у поєднанні з культивуванням в адекватних для стромальних клітин умовах, дозволяє отримати морфологічно майже однорідні культури, що характеризуються високим вмістом клітин з імунофенотипом МСК.

Функціональною ознакою вступу МСК в ендотеліальне диференціювання вважають здатність до утворення капіляроподібних структур при культивуванні на Матрігелі – матриксі базальних мембран, екстрагованим із саркоми миші й запропонованого рядом авторів для оцінки ендотеліального потенціалу МСК [3,4,9,10,13].

Розташування на 24 год в Матрігель СКЖТ, після проведення 4 пасажів моношарового культивування в середовищі експансії, дозволило спостерігати наступну картину: СКЖТ утворювали агрегати, форма яких була ближче до сферичної, на зовнішній поверхні цих агрегатів спостерігалися короткі променеподібні «відростки» (*рис. 3*).

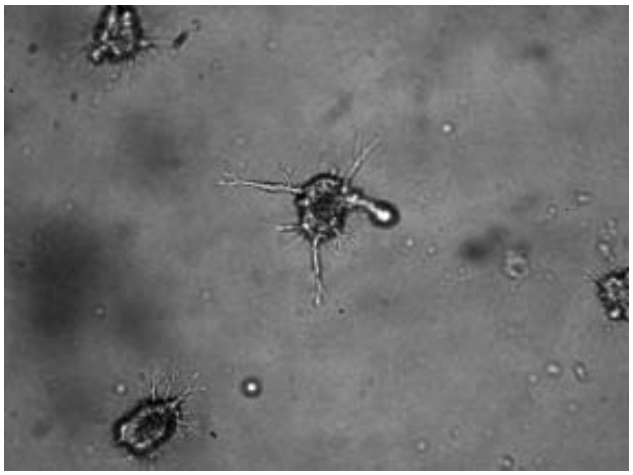

Рис. 3. Морфологія СКЖТ 4-го пасажу після 24 год. культивування в Матрігелі (збільшення Х100).

Поодинокі клітинні елементи демонстрували тенденцію до набуття веретеноподібної форми. Разом з тим, видно, що в приведених умовах стромальні клітини, виділені з жирової тканини, формували клітинні агрегати, з яких, у деяких випадках, витягувалися короткі капіляроподібні відростки.

У подальшому виконували пасаж МСК із вказаного джерела з переведенням їх у середовище EGM-2 і утриманням у даних умовах протягом 7 діб зі зміною середовища кожні 3 доби. Утворений щільний моношар складався з малозмінених фібробластоподібних клітин. Після трипсинізації цього моношару частину клітин переносили на Матрігель, а інші пересівали на пластик в середовищі EGM-2 для подальшого культивування (*рис. 1*).

У результаті, СКЖТ, що знаходилися в моношарі 7 діб під дією індукуючого середовища, протягом 24 год культивування в Матрігелі, окрім здатності адгезуватись один з одним з наступним утворенням клітинних сфероїдів, формували дендритоподібні структури різної товщини й довжини. Подібну картину отримано в роботах [3,4,9,10,13] і оцінено як капіляроподібну (*рис. 4*).

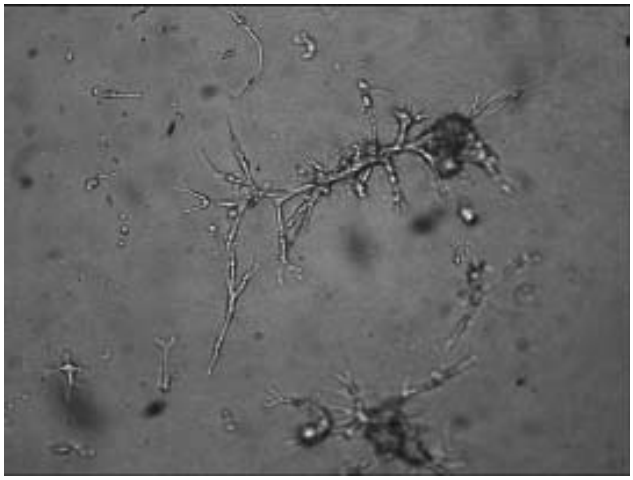

Рис. 4. Формування капіляроподібних структур СКЖТ в Матрігелі після 7 діб культивування в середовищі EGM-2 (збільшення Х100).

Видно, що клітини 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, що майже не відрізняються. Після трипсинізації, 10^5 клітин/мл розташовували в Матрігелі на 24 год. При цьому спостерігали вибудовування клітинних елементів в сітчасту структуру (*рис. 5*).

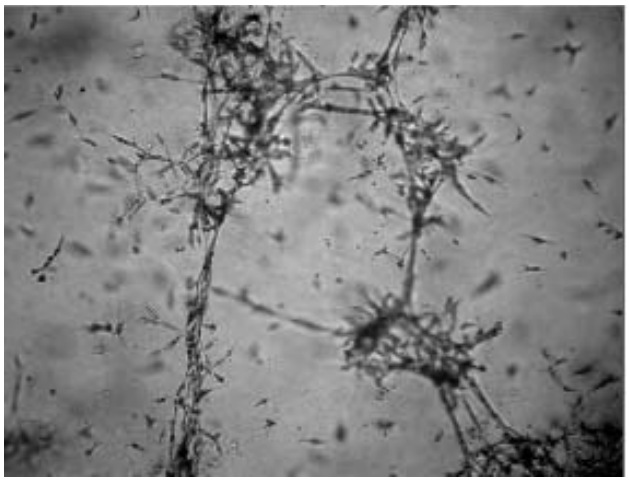

Рис. 5. Формування капіляроподібних структур СКЖТ в Матрігелі після 14 діб культивування в середовищі EGM-2 (збільшення Х100).

Клітинні елементи були орієнтовані в просторі Матрігелю у вигляді клітинних тяжів і рихлих скупчень (вузлів), характерних для капіляроподібних структур, що отримані in vitro [3,4,9,10,13]. У товщі Матрігелю спостерігалась певна кількість вільних, не включених в об'ємну структуру, клітин.

При гострому або хронічному ураженні судинного ендотелію, внаслідок розвитку патологічного процесу, його реконструкція може відбуватися за рахунок міграції довколишніх ендотеліальних клітин. Однак, зрілі ендотеліальні клітини є остаточно диференційованими з низькою проліферативною активністю, тому відновний процес пошкодженого ендотелію може бути утрудненим. У якості альтернативи ендотеліальним клітинам особливий інтерес представляють МСК. У ряді робіт показано їх високу проліферативну активність і мультилінійний диференційний потенціал. Нині кістковий мозок є основним джерелом МСК. Показано, що МСК кісткового мозку можуть бути диференційовані в ендотеліальному напрямку [4,10]. Однак, отримання кісткового мозку є болючою і непростою для пацієнта процедурою, а проліферативна активність і диференційний потенціал МСК кісткового мозку знижується з віком [14]. У зв'язку з цим, пошук альтернативних джерел МСК з наявністю ендотеліального потенціалу є актуальним завданням.

У ряді робіт показано можливість направленого ендотеліального диференціювання МСК, що виділені з кордової крові [7], пуповинного канатика [4], амніотичної рідини у присутності VEGF, EGF і гідрокортизону. За рахунок відносної легкості й малої інвазивності процедури отримання жирової тканини, її використання у якості джерела МСК відкриває великі перспективи в напрямку лікування хворих на серцево-судинну патологію.

У цій роботі проведено оцінку здатності стромальних клітин, що виділені з жирової тканини дорослої людини, утворювати капіляроподібні структури на різних етапах направленого in vitro диференціювання при культивуванні в позаклітинному матриксі. Позаклітинний матрикс не лише сприяє адгезії, міграції та проліферації ендотеліальних клітин, але забезпечує також необхідні умови для формування капілярного морфогенезу, його стабільності й дозрівання [5]. Показано, що не індуковані СКЖТ 4-го пасажу зі схожим імунофенотипом, мали слабку здатність утворювати капіляроподібні структури, що, вочевидь, пов'язано з недостатнім часом перебування клітин у середовищі індукції (24 год). Крім того, ці дані підтверджують відсутність у досліджуваній суспензії диференційованих ендотеліальних клітин. Надалі клітини індукували протягом 7 і 14 діб моношарового культивування в середовищі EGM-2, що містить ростові чинники FGF, EGF, VEGF. На 7-у і 14-у добу індукції клітини трипсинізували й знову розташовували в Матрігелі на 24 год. У результаті спостерігали наявність капіляроутвоюючої активності в стромальних клітинах. Слід зазначити, що СКЖТ характеризувалися швидкою й інтенсивною здібністю до формування капіляроподібних структур.

Висновки

1. Отже, у роботі показаний потенціал стромальних клітин жирової тканини людини до формування капіляроподібних структур in vitro у відповідь на чинники, що індукують ендотеліальне диференціювання.

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

3. Наведені відомості свідчать про здатність стромальних клітин жирової тканини людини вступати в ендотеліальне диференціювання і вказують на перспективність їх використання в регенеративній медицині для лікування хворих на серцево-судинну патологію та вказують на можливість проведення подібних експериментальних досліджень зі стовбуровими клітинами іншого походження.

Література

1. *Петренко А.* Выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства стромальных клеток-предшественников, выделенных из жировой ткани при монослойном культивировании / Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г. // Журнал АМН України. – 2008. – Т. 14, №2. – С. 354–365.
2. *Скоробогатова Н.* Остеогенные и адипогенные свойства фибробластоподобных клеток-предшественников фетальной печени человека / Скоробогатова Н.Г., Волкова Н.А., Петренко А.Ю. // Цитология. – 2008. – Т. 50, №4. – С. 317–322.

3. *Cao Y.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo / Cao Y., Sun Z., Liao L., Meng Y., Han Q., Zhao R.C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 332. – P. 370–379.
4. *Chen M.* Endothelial differentiation of Wharton's jelly–derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow–derived mesenchymal stem cells / Chen M.Y., Lie P.C., Li Z.L., Wei X. // Experimental Hematology. – 2009. – Vol. 37. – P. 629–640.
5. *Davis G.* Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization / Davis G.E., Senger D.R. // Circ. Res. – 2005. – Vol. 97. – P. 1093–1105.
6. *Dominici M.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315–317.
7. *Gang E.* In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells / Gang E.J., Jeong J.A., Han S. [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8. – P. 215–223.
8. *Kim S.* Endothelial Stem Cells and Precursors for Tissue Engineering: Cell Source, Differentiation, Selection, and Application / Kim S., Von Recum H. // Tissue engineering. – 2008. – Vol. 14, № 1. – P. 133–147.
9. *Liu J.W.* Characterization of endothelial cells derived from human mesenchymal stem cells / Liu J.W., Dunoyer-Geindre S., Serre-Beinier V. [et al.] // Journal of thrombosis and haemostasis. – 2007. – Vol. 5. – P. 826–834.
10. *Oswald J.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro / Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhauser M., Werner C. // Stem cells. – 2004. – Vol. 22. – P. 377–384.
11. *Petrenko A.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration / Petrenko A.Yu., Sukach A.N. // Analytical Biochem. – 1991. – Vol. 194, № 2. – P. 325–329.
12. *Planat-Benard V.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives / Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B., Andre M. [et al.] // Circulation. – 2004. – Vol. 109. – P. 656–668.
13. *Rouwkema J.* The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering / Rouwkema J., Westerweel P.E., de Boer J. [et al.] // Tissue engineering. Part A. – 2009. – Vol. 15. – P. 247–259.
14. *Stenderup K.* Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells / Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. // Bone. – 2003. – Vol. 33. – P. 919–926.

Відомості про авторів:

Петренко О.Ю., д. біол. н., професор, зав. каф. біохімії Інституту кріобіології і кріомедицини.

Петренко Ю.О., к. біол. н., докторант Інституту кріобіології і кріомедицини.

Салютін Р.В., к. мед. н., директор Координаційного центру трансплантології органів, клітин і тканин МОЗ України.

Домбровський Д.Б., к. мед. н., докторант Національного інституту хірургії і трансплантології ім. А.А. Шалімова АМН України.

Адреса для листування:

Салютін Руслан Вікторович, м. Київ, пр. Бажана, 61/14.