

А.А. Горкун<sup>1</sup>, И.Н. Сабурин<sup>1</sup>, Н.В. Кошелева<sup>1</sup>, И.М. Зурина<sup>1</sup>,  
А.А. Пулин<sup>1</sup>, М.Ю. Шагидулин<sup>2</sup>, Н.А. Онищенко<sup>2</sup>, В.С. Репин<sup>1</sup>

## **Эндотелиальные прогениторные клетки в мезенхимосфероидах пупочного канатика и их участие в процессах ангиогенеза и васкулогенеза при острой печеночной недостаточности**

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 123182, Москва, ул. Щукинская, 1

*Наши результаты показывают, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) индуцирует образование эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) в сфероидах мультипотентных мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика (ММСК ПК). ЭПК могут принимать участие в регенерации сосудов поврежденного органа. Через 1 мес. после ксеногенной трансплантации сфероидов наблюдали встраивание единичных человеческих Flk-1+ клеток в сосуды реципиента. Планируется дальнейший поиск оптимальных условий воздействия сфероидов на регенерацию печени через ангиогенез.*

**Ключевые слова:** 3D культура, ММСК, ЭПК, васкулогенез, ангиогенез

A.A. Gorkun<sup>1</sup>, I.N. Saburina<sup>1</sup>, N.V. Kosheleva<sup>1</sup>, I.M. Zurina<sup>1</sup>,  
A.A. Pulin<sup>1</sup>, M.Iu. Shagidulin<sup>2</sup>, N.A. Onischenko<sup>2</sup>, V.S. Repin<sup>1</sup>

## **Endothelial progenitor cells in umbilical cord-derived mezenhimosferoids and their participation in the processes of angiogenesis and vasculogenesis in acute liver failure**

<sup>1</sup> The Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Transplantology and Artificial Organs, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russia

*Our results show that vascular endothelial growth factor (VEGF) induces the appearance of endothelial progenitor cells (EPC) in spheroids of human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells (HUC-MMSC). EPC may taking part in the regeneration of blood vessels damaged organ. 1 month after xenogeneic transplantation spheroids observed in corporation of individual human Flk-1+ cells in the blood vessels of the recipient. We look forward to further experiments to find the optimal treatment conditions spheroids on liver regeneration through angiogenesis.*

**Key words:** 3D culture, MMSC, EPC, vasculogenesis, angiogenesis

В основе многих патологических состояний лежит нарушение структуры кровеносной системы [5]. Сосудистая сеть млекопитающих динамически перестраивается на протяжении всего онтогенеза в соответствии с потребностями окружающих тканей. Основными механизмами образования и роста кровеносных сосудов являются ангиогенез и васкулогенез. Ангиогенез представляет собой развитие новых сосудов из существующих за счет направленной миграции из них эндотелиальных клеток. Тогда как васкулогенез — образование и обновление эндотелия за счет отдель-

ных клеток, мигрировавших из крови и окружающих тканей. Было установлено, что за формирование и рост сосудов отвечают эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК), маркирующиеся экспрессией CD31+/Flk-1+/vWF+. Введение данных клеток в ишемизированные ткани [2, 8], в сердечную мышцу при инфаркте миокарда [6, 7] и в ткань печени при хронической недостаточности [9] приводило к восстановлению кровоснабжения и усилению регенерации. Восстановление кровеносной сети печени сопровождалось снижением фиброза. Однако клиническое применение ауто-ЭПК лимитировано их очень низким количеством в циркулирующей крови: 2—3 ЭПК/л [3]. Поэтому за последнее десятилетие силь-

**Для корреспонденции:** Горкун Анастасия Алексеевна, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: stgork@gmail.com

но возрос интерес к лабораторному получению ЭПК из доступных резервов мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) взрослых тканей. Пупочный канатик (ПК) на сегодняшний день также является источником ММСК [4] и может быть новым источником получения и ЭПК.

Целью нашей работы стало изучение способности ММСК ПК дифференцироваться в ЭПК в 3D культуре и сохранять свои эндотелиальные характеристики при помещении в условия развития патологического процесса.

### Методика

#### 2D культивирование ММСК ПК

Для получения гомогенной популяции ММСК ПК первичную диссоциированную культуру клонировали на чашках Петри в плотности 3—4 кл./см<sup>2</sup>. Дальнейшее культивирование проводили в стандартных условиях (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) в полной ростовой среде DMEM/F12 (1:1, ПанЭко) с добавлением глутамина (2 mM L, ПанЭко), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко), инсулин-трансферрин-селенита (1:100, ПанЭко), bFGF (1:1000, Prospec), гепарина (1,5:1000, Синтез) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone), замену среды осуществляли каждые 3 суток. После четвертого пассажа выращивания в монослойной культуре ММСК ПК переводили в условия 3D культивирования.

#### 3D культивирование ММСК ПК на агарозных планшетах

Для получения 3D сфероидов ММСК ПК применяли 3D культивирование в агарозных планшетах, которое позволяло получать большое количество идентичных сфероидов. Агарозные планшеты получали при полимеризации агарозы (Sigma) в специальных пластмассовых формочках (3D PetriDishes, Microtissue, США). После полимеризации 256-луночные агарозные планшеты помещали на чашки Петри (35 мм) лунками вверх и заливали их суспензией диссоциированных клеток в 190 мкл среды. Концентрацию клеток подбирали в зависимости от диаметра и количества лунок и желаемой плотности формирующихся сфероидов. В нашем случае она составила примерно  $2,7 \times 10^6$  кл./мл. Дальнейшее культивирование проводили в индукционной среде следующего состава: DMEM/F12 (1:1, ПанЭко) с добавлением глутамина (2 mM L, ПанЭко), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко), ИТС (1:100, ПанЭко) (инсулин, трансферрин, селенит), bFGF (1:1000, Prospec), VEGF (1:10000, Prospec), гепарина (1,5:1000, Синтез) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone).

#### Моделирование ангиогенеза в матригеле

Капли матригеля (BD Bioscience) наносили на дно предварительно охлажденных до -20°C чашек Петри (35 мм) с помощью холодной серологической пипетки и оставляли на 30 мин при 37°C для полимеризации.

Сформировавшиеся сфероиды из ММСК ПК собирали с помощью наконечника до 1000 мкл в центрифужную пробирку (15 мл) и центрифугировали (5 мин, 600 об./мин, 60 g). После удаления супернатанта, сфероиды аккуратно наконечником (1000 мкл) размешивали в 200 мкл ростовой среды и с помощью инсулинового шприца вводили их в матригель. Чашки Петри с матригелем после введения сфероидов заливали индукционной средой и культивировали в течение 9 суток. Визуализацию роста тубулоподобных структур осуществляли с помощью фазово-контрастного микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония), фоторегистрацию производили цифровой камерой Invenio3S (Olympus, Япония) в программе DeltaPix (Olympus, Япония).

#### Модель острой печеночной недостаточности

Модель токсического повреждения печени воспроизводилась на крысах породы Wistar по стандартному протоколу. Животным вводили CCl<sub>4</sub> (2 мл/кг веса в 10%-ном растворе растительного масла) внутривенно дважды в неделю в течение 6 недель. Инъекцию клеточного материала проводили через 7 суток после прекращения введения CCl<sub>4</sub>.

#### Инъекция васкуляризованных сфероидов

Непосредственно перед введением модельным животным сформированные сфероиды после культивирования в индукционной среде на агарозных планшетах в течение семи дней в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) собирали с помощью наконечника (1000 мкл) в пробирку (15 мл) и центрифугировали (5 мин, 600 об./мин, 60 g). После удаления супернатанта, сфероиды аккуратно размешивали в 200 мкл физиологического раствора и с помощью инсулинового шприца инъецировали в нижнюю долю печени во время операции. Иммуносупрессию не проводили. Анестезию животных осуществляли с помощью золетила (0,5 мл на 100 г веса). Иммуногистохимическое исследование поврежденной печени производили через 1 мес. после инъекции.

#### Фиксация 2D и 3D культур клеток и печени крыс

Для дальнейшего иммуногистохимического анализа сфероиды, предварительно очищенные от культуральной среды, фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 20 мин. Затем сфероиды помещали в 20%-ный раствор глюкозы на 4 ч и готовили

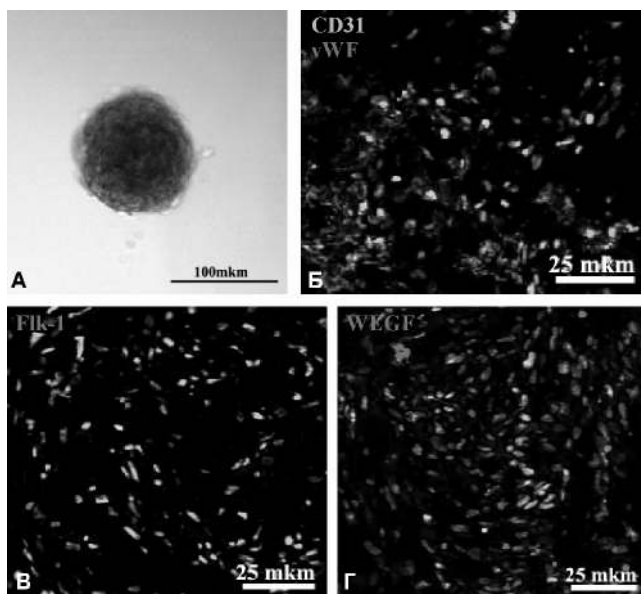


Рис. 1. Экспрессия маркеров ЭПК в 3D культуре ММСК ПК. Световая микроскопия. А — внешний вид сфероидов ММСК ПК; Б — экспрессия CD31 (зеленый) и vWF (красный), стрелками указаны люмены; В — экспрессия Flk-1; Г — экспрессия VEGF. Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). Лазерная конфокальная микроскопия

серию срезов толщиной 10—20 на криотоме SM1850UV (Leica, Германия). После декапитации печень крыс фиксировали в 10%-ном растворе формалина в течение суток. Далее печень помещали на 12 ч в 20%-ный раствор сахарозы. По метке выбирали место локального введения сфероидов и готовили серию срезов сфероидов толщиной 10 мкм на вибротоме VT 1200 S (Leica, Германия).

### Иммуноцитохимия

Срезы сфероидов инкубировали с первичными антителами к CD31, vWF, Flk-1, VEGF (ThermoScientific), а затем с видоспецифичными вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами

FITC и DyLight594 (ThermoScientific). Полученные препараты накрывали покровным стеклом, и анализировали в видимом и ультрафиолетовом световых диапазонах под микроскопами Axiovert 25 (CarlZeiss, Германия), Axiovert 200M и лазерным конфокальным микроскопом OlympusFluoview FV10I (Olympus, Япония). Срезы поврежденной печени крыс окрашивали антителами к human nuclei, Flk-1 и к альфафетопротейну (ThermoScientific) и анализировали под флуоресцентным микроскопом Axiovert 25 (CarlZeiss, Германия). Ядра докрашивали флуоресцентным красителем бис-бензimid — Hoechst 33258 (Fluka).

### Результаты и обсуждение

Сфероидогенез ММСК ПК в индукционной среде приводил к появлению на 7-е сутки культивирования CD31+/vWF+/Flk-1+/VEGF+ клеток в составе сpherоида (рис. 1). Иммуноцитохимический анализ показал, что CD31+ клетки внутри сpherоида формируют структуры, напоминающие просветы сосудов — люмены (рис. 1Б, стрелки). Помещение васкуляризованных сpherоидов в матригель сопровождалось образованием разветвленной сети тубулоподобных структур (рис. 2). Уже на вторые сутки происходила направленная миграция клеток, формирующих новый тяж вслед за ведущей клеткой (рис. 2А). На 5-е сутки культивирования количество тяжей увеличивалось, наблюдалось их ветвление, к 9-м суткам — клетки сpherоида формировали разветвленный плексус (рис. 2В).

При ксеногенной трансплантации индуцированных VEGF мезенхимосpherоидов ПК в поврежденную ткань печени крыс через 1 мес. после инъекции мы наблюдали переживание отдельных клеток и встраивание их в сосуды реципиента даже без иммуносупрессии (рис. 3). Клетки, несущие маркер Flk-1 (маркер эндотелиальных клеток), находились в эндотелиальном слое сосудов печени (рис. 3Б).

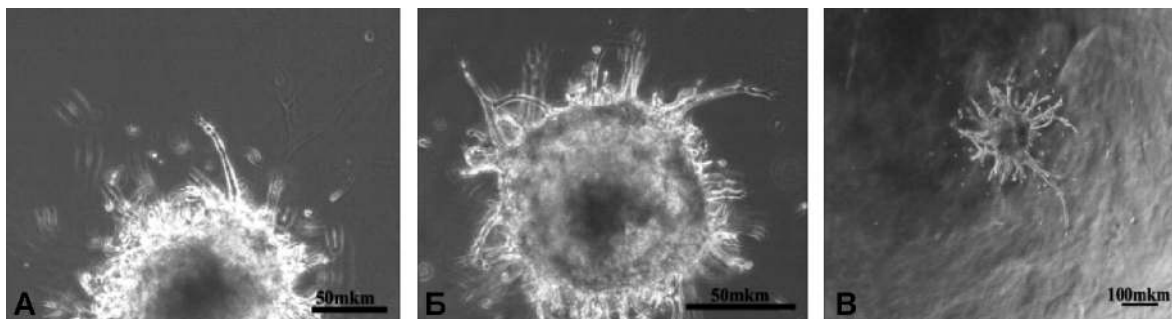


Рис. 2. Образование тубулоподобных структур при культивировании сфероидов ММСК ПК в матригеле: А — на 2-е сутки; Б — на 5-е сутки; В — на 9-е сутки. Световая микроскопия

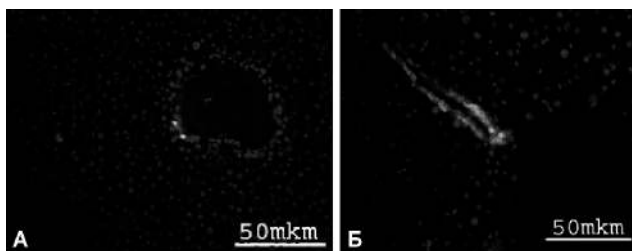


Рис. 3. Исследование выживаемости и сохранения экспрессии маркеров эндотелия клетками 3D культуры печени в условиях развития патологического процесса:

А — интеграция выживших человеческих клеток (зеленый) с тканями печени реципиента; Б — клетки человека (зеленый), встроившиеся в стенку сосуда, экспрессируют Flk-1 наравне с эндотелиоцитами реципиента (красный)

Наши результаты показывают, что VEGF индуцирует образование в сфероиде ММСК ПК ЭПК, способных принимать участие в регенерации сосудов поврежденного органа. Мезенхимосфероиды оказались пока единственной моделью образования люменов в тканеподобной структуре. Сегодня это наиболее естественный прототип новообразования и регенерации сосудистой сети *in vivo*. Встраивание клеток и сохранение экспрессии специфического маркера свидетельствует о регенераторном значении этого феномена. Наблюдаемый нами ангиогенез может способствовать обратному развитию фиброза органа [9]. «Не только экспериментальные, но и ряд клинических наблюдений свидетельствуют о том, что при определенных условиях избыточно разросшаяся, фиброзная ткань может исчезнуть» [1]. Разработанный метод получения васкуляризованных мезенхимосфероидов имеет существенное значение для патологической физиологии, а

также может найти применение в тканевой инженерии и регенерационной медицине.

### Список литературы

1. *Саркисов Д.С.* Очерки по структурным основам гомеостаза. — М.: Медицина, 1977. — 35 с.
2. *Asahara T.* Endothelial progenitor cells for vascular medicine // *Yakugaku Zasshi.* — 2007. — Vol. 127, №5. — P. 841—845.
3. *Asahara T., Murohara T., Sullivan A.* et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // *Science.* — 1997. — №275. — P. 964—967.
4. *Baksh D., Yao R., Tuan R.S.* Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow // *Stem Cells.* — 2007. — Vol. 25, №6. — P. 1384—1392.
5. *Chappell J.C., Bautch V.L.* Vascular development: genetic mechanisms and links to vascular disease // *Curr. Top. Dev. Biol.* — 2010. — Vol. 90. — P. 43—72.
6. *Chong J.J.* Cell therapy for left ventricular dysfunction: an overview for cardiac clinicians // *Heart Lung Circ.* — 2012. — Vol. 21, №9. — P. 532—542.
7. *Jujo K., Ji M., Losordo D.W.* Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2008. — Vol. 45, №4. — P. 530—544.
8. *Kim S.W., Kim H., Cho H.J.* et al. Human peripheral blood-derived CD31+ cells have robust angiogenic and vasculogenic properties and are effective for treating ischemic vascular disease // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2010. — Vol. 56, №7. — P. 593—607.
9. *Ueno T., Nakamura T., Torimura T., Sata M.* Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis // *Med. Mol. Morphol.* — 2006. — Vol. 39, №1. — P. 16—21.

Поступила 24.10.12

### Сведения об авторах:

*Сабурина Ирина Николаевна*, д-р биол. наук, зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Кошелева Настасья Владимировна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Зурина Ирина Михайловна*, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Пулин Андрей Алексеевич*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития, ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Шагидулин Мурат Юнусович*, канд. мед. наук, зав. лаб. по клиническим исследованиям медицинских изделий и технологий ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России

*Онищенко Нина Андреевна*, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. биотехнологии стволовых клеток, акад. Академии медико-технических наук РФ ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России

*Репин Вадим Сергеевич*, д-р мед. наук, проф. чл.-кор. РАМН, гл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН