

УДК 612.621.38.014:57.043

**В.А. Шаблій, М.Д. Кучма, В.М. Кирик*,
Г.М. Онищенко, Г.С. Лобинцева**

ТОВ «Інститут клітинної терапії», м. Київ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

**ДУ «Інститут генетичної і регенеративної медицини АМН України»*

ХАРАКТЕР ЕКСПРЕСІЇ ОКРЕМИХ ПОВЕРХНЕВИХ МАРКЕРІВ У КУЛЬТУРИ КЛІТИН ПУПОВИННОЇ ВЕНИ ЛЮДИНИ

Показано наявність популяції стромальних та ендотеліальних клітин у деяких культурах пуповинної вени людини. Такі популяції характеризувались імунофенотипами CD31⁺CD90⁺CD73^{hi}CD105^{low}CD34⁻CD45⁻CD14⁻ та CD31⁺CD90⁻CD73^{low}CD105^{hi} відповідно. З пасажуванням у культурах ендотеліальних клітин виявлено тенденцію до зниження експресії маркера CD73. Показано, що низький рівень експресії маркера CD90 при одночасному високому рівні експресії CD105 може свідчити про наявність популяції ендотеліальних клітин у культурі пуповинної вени людини.

Ключові слова: пуповинна вена людини, стромальні клітини, ендотеліальні клітини, змішані культури.

Існують багато методів отримання культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з пуповинної вени людини, однак всі вони не виключають можливості отримання змішаної культури клітин з ендотеліоцитами [1, 2]. Відомо багато факторів, що впливають на ефективність отримання культури ММСК, а саме: метод ферментації [3], склад середовища культивування [4].

Велика кількість поверхневих маркерів ММСК експресуються на ендотеліальних клітинах, а саме: CD73, CD105, CD146, CD44 [3]. Однак ендотеліальні клітини можна визначити за експресією CD31, CD144 [3], фактора Віллебрандта [5] та відсутністю CD90 [6].

Потрібно відмітити, що пошук оптимальних методів імунофенотипування культури клітин пуповини з метою визначення наявності як ендотеліальних, так і мезенхімальних стромальних елементів є досить актуальним.

Метою дослідження було охарактеризувати експресію деяких поверхневих маркерів на ендотеліальних клітинах пуповини людини для оптимізації методу їх детекції в культурі клітин ММСК пуповини.

Матеріал і методи. Отримання культури клітин з пуповинної вени людини.

Пуповину отримували після народження дитини з інформованої згоди жінок. Пуповину поміщали в розчин Хенксу з додаванням 30 од/мл гепарину, 50 мкг/мл стрептоміцину, 100 од/мл пеніциліну та відразу промивали від крові. Після відмивки пуповинної крові пуповину інкубували в розчині, що містив 5 мкг/мл амфотерицину протягом 20 хв. Пуповинну вену заливали нагрітим до 37 °C розчином 0,1 % колагенази (Serva) та інкубували 30–40 хв при температурі 37 °C, після чого вену промивали середовищем DMEM (Sigma) з 5 мМ HEPES. Для зниження активності ферментів додавали FBS (Sigma) до кінцевої концентрації 10 %. Фільтрували отриману суспензію через фільтр з діаметром пор 100 мкм. Отриманий фільтрат центрифугували 5 хв при 300 g. Відбирали супернатант і ресуспендували осад клітин у розчині DPBS (Gibco) кімнатної температури. Підрахунок кількості клітин в отриманій суспензії проводили в камері Горяєва. Клітини висівали в культуральні флакони для адгезивних клітин з розрахунку 120–160 тис. клітин на 1 см². Середовище для культивування DMEM містило 15 % FBS (Gibco), 5 мМ HEPES, 2 мМ L-глутаміну (Biomedicals), 20 нг/мл FGF (Biochrom), 50 мкг/мл стрептоміцину, 100 од/мл пеніциліну.

© В.А. Шаблій, М.Д. Кучма, В.М. Кирик та ін., 2011

Культивування проводили при 37 °С в 5 % CO₂ зі зміною середовища кожні 3–4 доби. Пересів здійснювали при досягненні культурою 80–90 % конфлюентності у співвідношенні 1:3. Для пересіву використовували 0,05 % розчин трипсину з ЕДТА (Biochrom).

Кріоконсервування культури клітин.

Після зняття клітин з культурального пластику за допомогою 0,05 % розчину трипсину з ЕДТА (Biochrom) суспензію клітин центрифугували 5 хв при 300 g. Клітини ресуспендували в розчині Хенкса з подальшим додаванням 10 % розчину ДМСО у співвідношенні 1:1. Заморожування проводили за трьохетапною програмою. Кріоконсервовані зразки зберігали у рідкому азоті при температурі –196 °С.

Імуноцитохімічне дослідження.

Для проведення імуноцитохімічного аналізу кріоконсервовані клітини розморожували на водяній бані при температурі 38–40 °С до появи рідкої фази з подальшим відтаюванням при кімнатній температурі. Краплю (10 мкл) з клітинами наносили на предметне скельце та центрифугували при 400 g протягом 5–10 хв. Цитоспіни фіксували сумішшю ацетону та метанолу 1:1. Ендогенну пероксидазну активність інгібували 0,3 % розчином H₂O₂ протягом 5 хв. Інкубували з первинними антитілами проти фактора Віллебранда (Dako, Данія) та проводили візуалізацію з використанням Mouse/Rabbit PolyVue HPR/DAB Detection System (DBS, США).

Проточна цитофлуориметрія.

Культуру клітин знімали з культурального пластику 0,05 % розчином трипсину з ЕДТА. До суспензії клітин додавали FBS (Gibco) до кінцевої концентрації 10 % та центрифугували при 250 g протягом 10 хв. Імунофенотипування суспензії клітин проводили методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл, кон'югованих з флуорохромами (Becton Dickinson, США) в робочій концентрації 0,5 мкг на 10⁶ клітин: anti-CD34 APC, anti-CD90 FITC, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD105 PerCP-Cy 5.5, anti-CD73 PE, anti-CD31 PE. Фенотипування проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програми FACS Diva 6.1, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 5 параметрів флуоресценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів при багатопараметрич-

ному аналізі використовували контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним з антитіл окремо (single stained control) та зразки з комбінацією кількох антитіл без одного з них (fluorescence minus one control).

Результати та їх обговорення. При культивуванні клітин пуповинної вени на першому пасажі спостерігався ріст як фібробластоподібних клітин строми, так і ендотеліальних клітин (рис. 1). Стромальні клітини були фібробластоподібними та мали більше виростів (рис. 2). Ендотеліальні клітини мали характерну морфологію, схожу на бруківку, та утворювали колонії прозорих клітин (рис. 3, а). На периферії клітини розміщувались по колу, що надавало колоніям чіткого контуру (рис. 3, б). Для таких клітин була характерна багат шаровість при тривалому культивуванні на відміну від ендотелію.

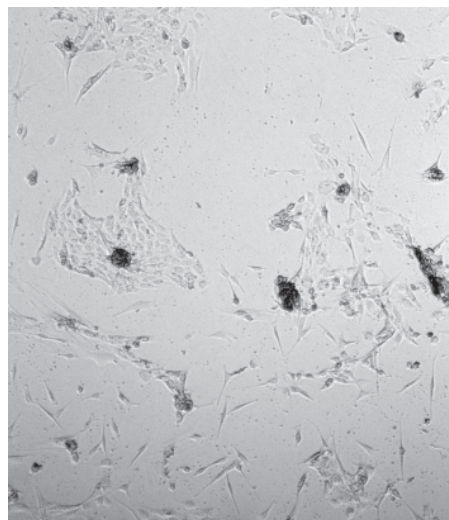


Рис. 1. Змішана культура пуповинної вени людини

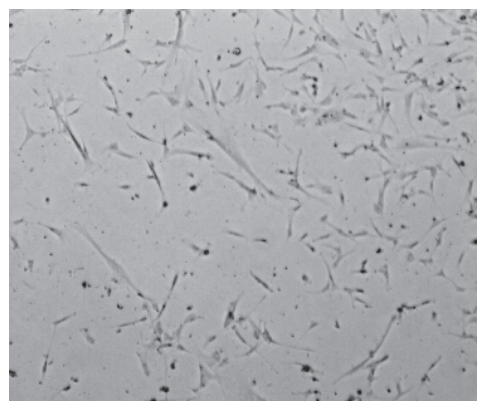


Рис. 2. Культура мезенхімальних клітин з пуповинної вени людини

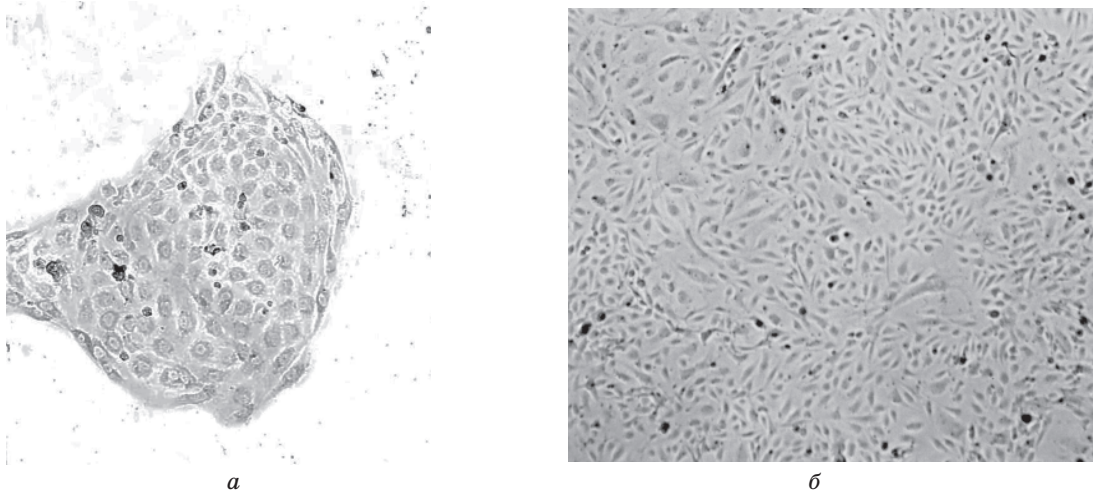


Рис. 3. Культура ендотеліальних клітин з пуповинної вени людини:
а — колонії прозорих клітин; б — колонії з чітким контуром

Використання мультипараметричного аналізу культури деяких ліній клітин пуповинної вени показало, що вони мають імунотип мезенхімальних стромальних клітин $CD90^+CD73^+CD105^+CD31^+CD34^-CD45^-$ (рис. 4).

На відміну від стромальних клітин, ендотеліальні клітини не експресували CD90 та були позитивні за CD31 (рис. 5).

Також проведення імуноцитохімічного аналізу виявило експресію фактора Віллебранда (рис. 6).

Експресія CD31 і фактора Віллебранда в культурі клітин пуповинної вени свідчить про те, що вони є ендотеліальними клітинами [6].

В роботі Rebecca C. Schugar et al. показано, що при культивуванні клітин, отриманих шляхом ферментування стінок пу-

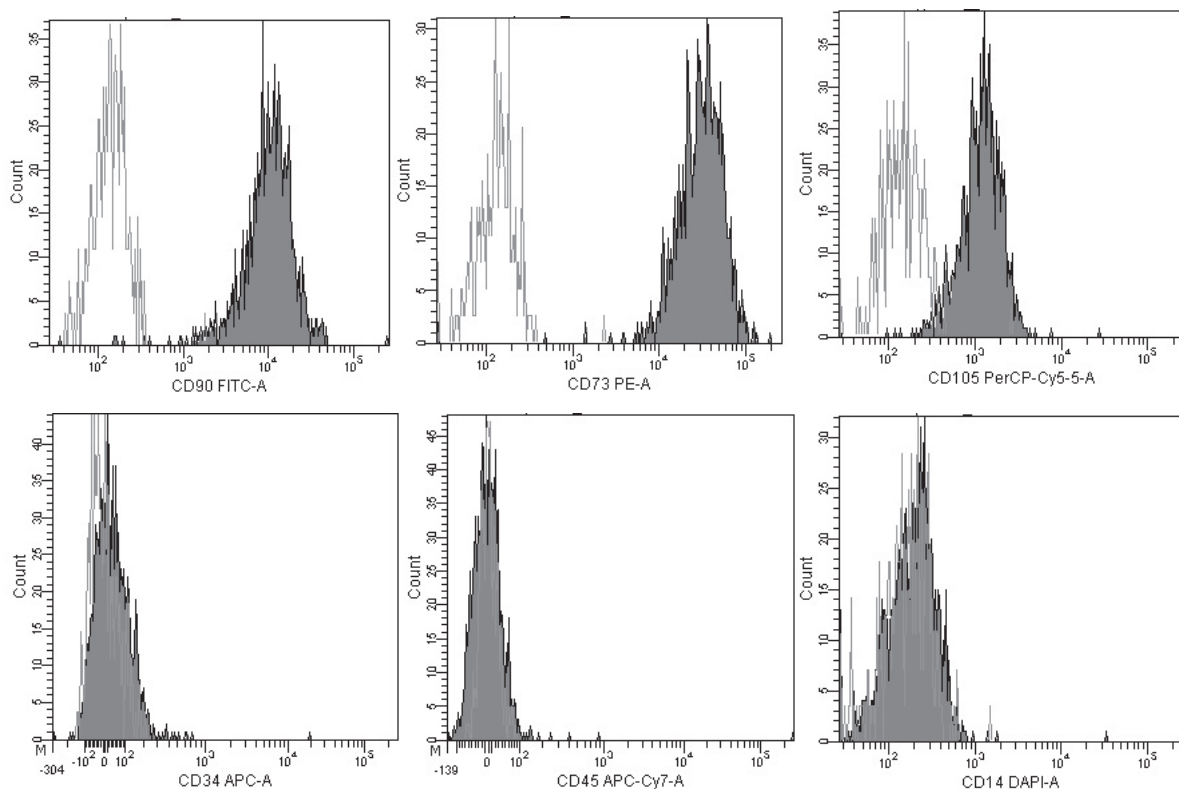


Рис. 4. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD14 в культурі стромальних клітин, отриманих з пуповинної вени людини, 5-й пасаж: сірий контур — фоновий рівень флуоресценції клітин; чорний колір — інтенсивність флуоресценції після інкубації з антитілами

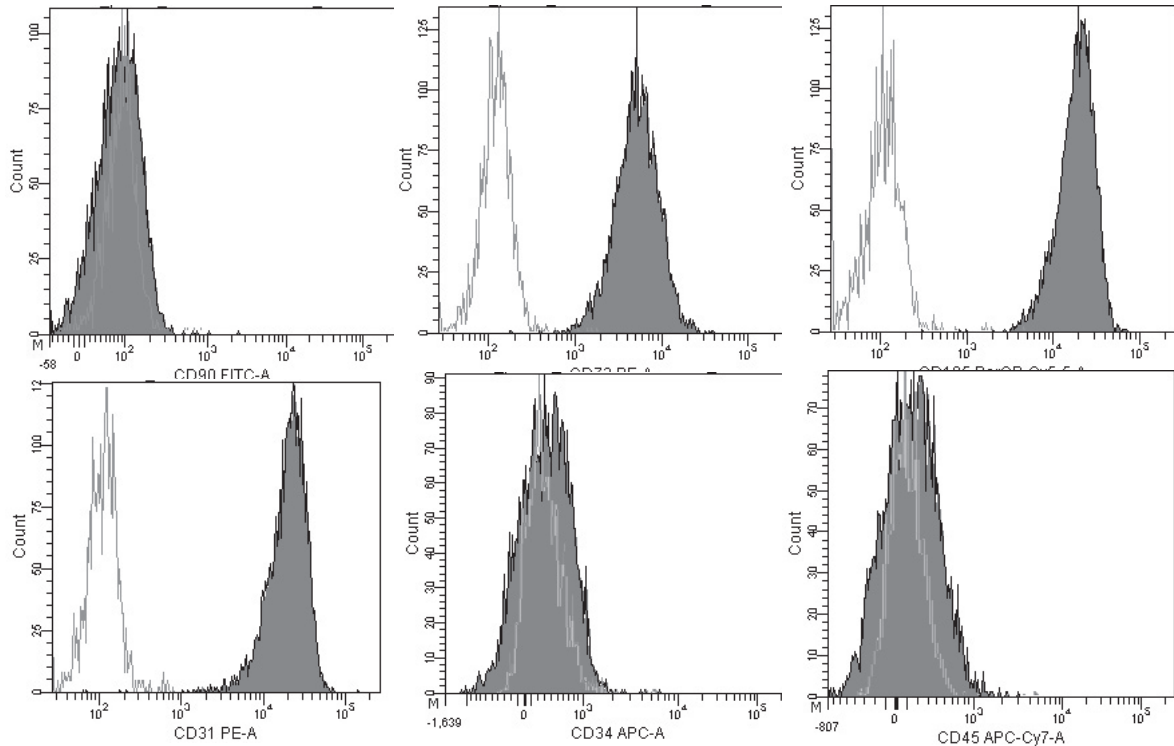


Рис. 5. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105, CD31, CD34, CD45 в культурі ендотеліальних клітин, отриманих з пуповинної вени людини, 5-й пасаж: сірий контур — фоновий рівень флюоресценції клітин; чорний колір — інтенсивність флюоресценції після інкубації з антитілами

виної вени колагеназою, спостерігається зростання кількості стромальних елементів з фенотипом $CD90^+CD144^-CD146^{50\%}$, тоді як при використанні диспази переважають клітини $CD90^+CD144^+CD146^{100\%}$ [3].

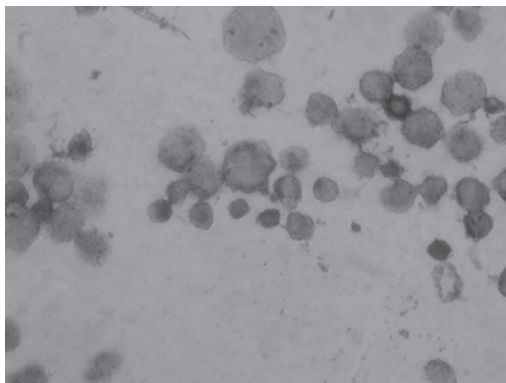


Рис. 6. Цитоспіновий препарат кріоконсервованої культури ендотеліальних клітин пуповинної вени людини. Імуноцитохімічне забарвлення на фактор Віллебрандта, $\times 100$

Цікавим виявився характер експресії поверхневих маркерів CD73 та CD105. Ендотеліальні клітин порівняно слабо експресували CD73 та сильно — CD105 (рис. 3), тоді як стромальні клітини мали високий рівень експресії CD73 та низький — CD105 (рис. 2).

В роботі Andrew C. Voquest et al. було показано, що всі ендотеліальні клітини, виділені з жирової тканини, позитивні на CD31 і мали високий рівень експресії CD105 порівняно з фракцією CD31⁻ [7]. Відомо, що CD105 (ендогліл) бере участь у регуляції організації цитоскелета клітин та їх міграції, чим відіграє важливу роль у розвитку серцево-судинної системи та ремоделюванні судин [8].

Також потрібно відмітити, що з пасажуванням ендотеліальних клітин спостерігається зниження експресії CD73 (рис. 7).

В змішаних культурах клітин пуповини людина популяція ендотеліальних клітин мала імунофенотип $CD31^+CD90^-CD73^{low}CD105^{hi}$, тоді як стромальні клітини були представлені популяцією $CD31^-CD90^+CD73^{hi}CD105^{low}$ (рис. 8).

Потрібно відмітити, що в деяких змішаних культурах при домінуванні популяції ендотеліальних клітин спостерігається подібний рівень експресії CD73 та CD105 на стромальних клітинах (рис. 9).

Отже, нами показано, що в культурі клітин пуповинної вени людини можуть бути стромальні та ендотеліальні популяції клітин, які розрізняються за характером експресії основних маркерів мезенхімаль-

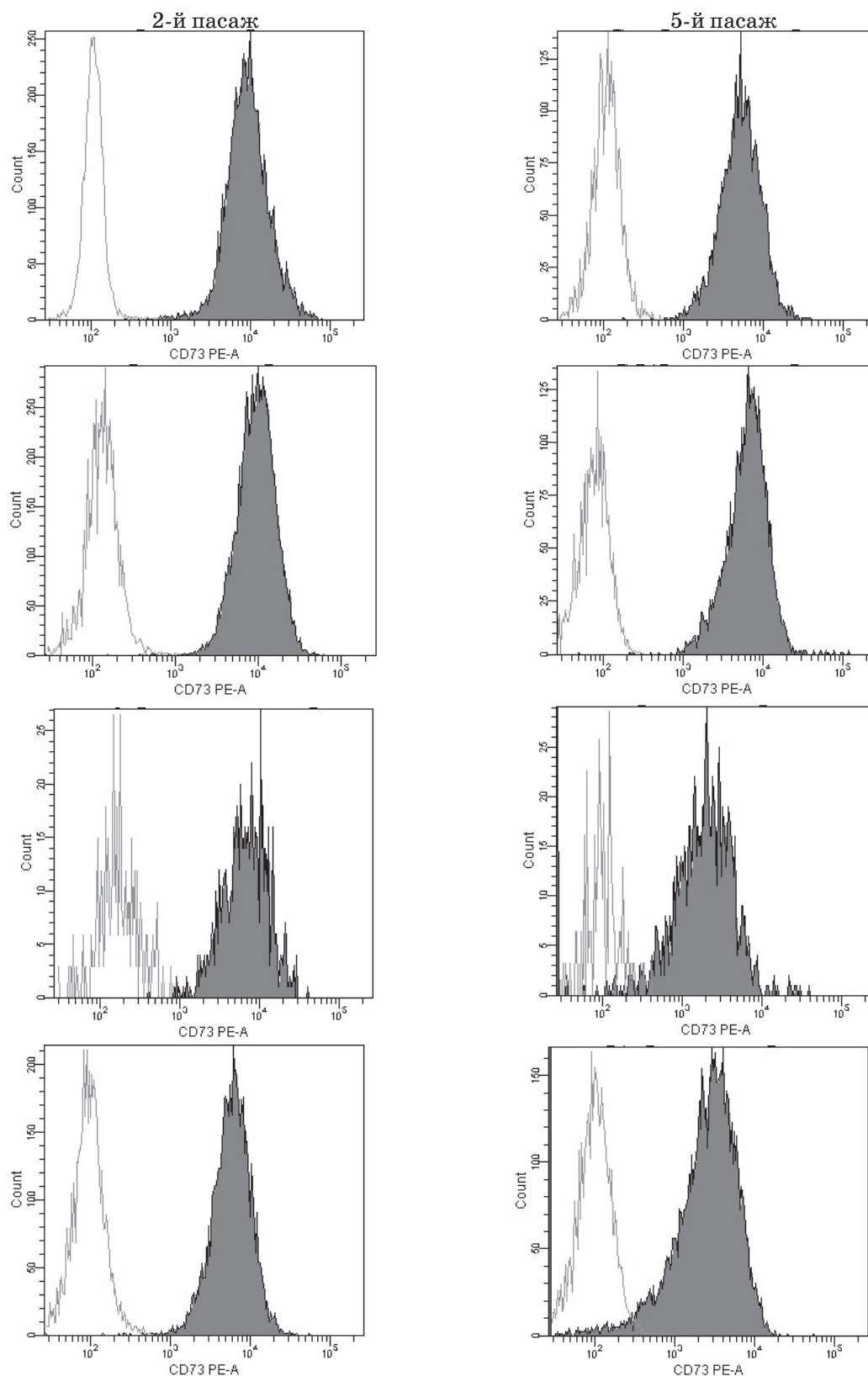


Рис. 7. Гістограми експресії поверхневого маркера CD73 в культурах ендотеліальних клітин, отриманих з пуповинної вени людини (1–4): сірий контур — фоновий рівень флюоресценції клітин; чорний колір — інтенсивність флюоресценції після інкубації з антитілами; mean — середнє арифметичне інтенсивності флюоресценції

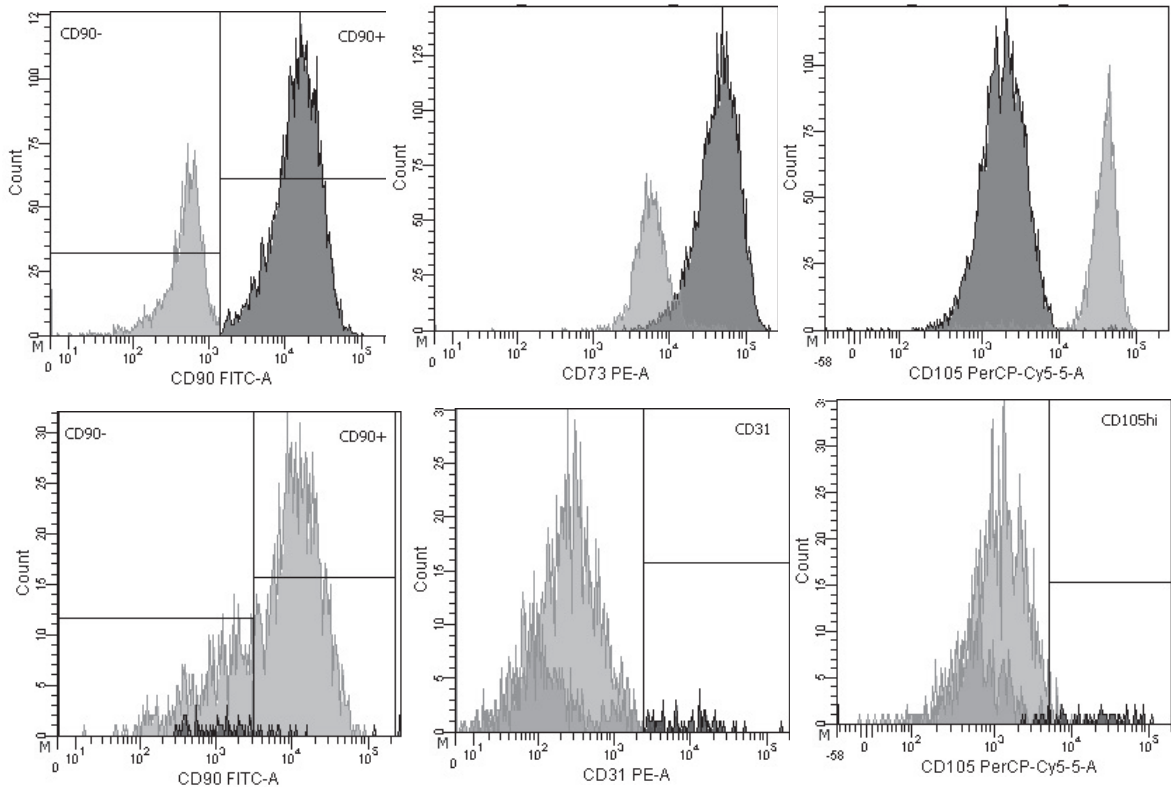


Рис. 8. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD31, CD105 у культурі клітин з пуповинної вени людини, 3-й пасаж: чорний колір — популяція CD31⁺ клітин, сірий — CD31⁻

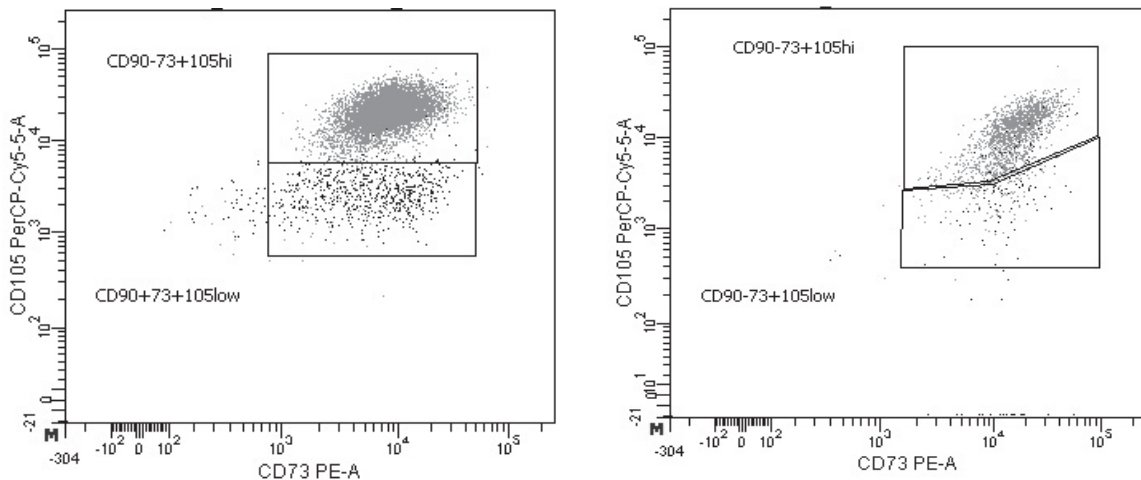


Рис. 9. Гістограми розподілу популяцій CD90⁻73⁺105^{hi} та CD90⁺73⁺105^{low} у 2 культурах клітин, отриманих з пуповинної вени людини, 1-й пасаж

них стромальних клітин CD90, CD73 та CD105. Встановлено, що в змішаних культурах пуповини людини стромальні клітини представлені популяцією CD31⁻CD90⁺CD73⁺CD105^{low}CD34⁻CD45⁻CD14⁻.

Висновки

1. Показано наявність у деяких культурах клітин пуповинної вени людини популяцій як стромальних, так і ендотеліальних клітин.

2. Виявлено різницю в інтенсивності експресії маркерів CD73 та CD105 у культурах стромальних та ендотеліальних клітин.

3. Низький рівень експресії маркера CD90 при одночасному високому рівні експресії CD105 може свідчити про наявність популяції ендотеліальних клітин у культурі.

4. З пасажуванням в культурах ендотеліальних клітин виявлено зниження експресії маркера CD73.

Список літератури

1. *Sachin S. Kadam*. Simultaneous isolation of vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord / Sachin S. Kadam, Shubha Tiwari, Ramesh R. Bhone // *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. — 2009. — V. 131, № 2. — P. 267–282.
2. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells / D. T. Covas, J. L. C. Jiufie, A. R. L. Silva, M. D. Orella // *Brazilian J. of Medical and Biological Research*. — 2003. — V. 36. — P. 1179–1183.
3. *Rebecca C. Schugar*. High Harvest Yield, High Expansion, and Phenotype Stability of CD146 Mesenchymal Stromal Cells from Whole Primitive Human Umbilical Cord Tissue / Rebecca C. Schugar, Steven M. Chirieleison, E. Kristin // *J. of Biomedicine and Biotechnology*. — 2009. — P. 1–11.
4. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors / R. Sarugaser, D. Lickorish, D. Baksh [et al.] // *Stem Cells*. — 2005. — V. 23. — P. 220–229.
5. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood / D. A. Ingram, L. E. Mead, H. Tanaka [et al.] // *Blood*. — 2004. — V. 104, № 9. — P. 2752–2760.
6. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures / L. Kisselbach, M. Merges, A. Bossie, A. Boyd // *Cytotechnology*. — 2009. — V. 59, № 1. — P. 31–44.
7. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture / Andrew C. Boquest, A. Shahdadfar, Katrine Fronsdal [et al.] // *Molecular Biology of the Cell*. — 2005. — V. 16. — P. 1131–1141.
8. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the lim family of proteins / Sanz-Rodriguez Francisco, Mercedes Guerrero-Esteo, Luisa-Maria Botella, Denis Banville // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, № 31. — P. 32858–32868.

В.А. Шаблій, М.Д. Кучма, В.М. Кирик, Г.М. Онищенко, Г.С. Лобынцева

ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ ОТДЕЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПУПОВИНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

Показано наличие популяций стромальных и эндотелиальных клеток в некоторых культурах пуповинной вены человека. Такие популяции характеризовались иммунофенотипами CD31⁻CD90⁺CD73^{hi}CD105^{low}CD34⁻CD45⁻CD14⁻ та CD31⁺CD90⁻CD73^{low}CD105^{hi} соответственно. При пассажировании в культурах эндотелиальных клеток обнаружено тенденцию к снижению экспрессии маркера CD73. Показано, что низкая экспрессия маркера CD90 при одновременном высоком уровне экспрессии CD105 может свидетельствовать о наличии популяции эндотелиальных клеток в культуре пуповинной вены человека.

Ключевые слова: пуповинная вена человека, стромальные клетки, эндотелиальные клетки, смешанная культура.

V.A. Shablii, M.D. Kuchma, V.M. Kyryk, G.M. Onishchenko, G.S. Lobintseva

CHARACTER OF THE SURFACE MARKERS EXPRESSION ON CULTURED CELLS DERIVED FROM HUMAN UMBILICAL VEIN

It was shown, that some cultures from the human umbilical vein contain the populations of stromal and endothelial cells. These populations were characterized by immunophenotype CD31⁻CD90⁺CD73^{hi}CD105^{low}CD34⁻CD45⁻CD14⁻ та CD31⁺CD90⁻CD73^{low}CD105^{hi} respectively. The expression of the marker CD73 of endothelial cells decreased during subcultivation. It was shown, that the low expression of the marker CD90 together with the high level of CD105 can serve as indicator of presence of endothelial cells in the cultures from the human umbilical vein.

Key words: umbilical cord vein, stromal cells, endothelial cells, mixed culture.