

Изучение ангиогенного потенциала мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека

Сабурина И.Н.^{1,2}, Горкун А.А.¹, Зурина И.М.¹, Кошелева Н.В.^{1,3}, Репин В.С.^{1,2}

¹ — ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² — ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования, 123995, Москва

³ — Московский государственный университет им. МВ. Ломоносова, Москва,

Для изучения ангиогенного потенциала клеточных культур впервые разработана новая 3D модель с использованием VEGF индуцированных сфероидов из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК). На примере ММСК пупочного канатика (ММСК ПК) показано, что в процессе формирования сфероидов из ММСК возрастало количество ранних эндотелиальных прогениторных клеток, экспрессирующих CD34+, CD133+ по сравнению с 2D-культурой. Добавление VEGF в питательную среду индуцировало экспрессию маркеров поздних эндотелиальных прогениторных клеток (CD31+/vWF+/Flk-1+/VEGF+). Последующее культивирование индуцированных сфероидов ММСК в матрикеле сопровождалось формированием тубулоподобных структур.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ангиогенез, эндотелиальные прогениторные клетки, фактор роста эндотелия сосудов, матрикель

Список сокращений: ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; ММСК ПК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки пупочного канатика; VEGF — фактор роста эндотелия сосудов; CD31 — маркер эндотелиальных клеток; CD34 — маркер эндотелиальных прогениторных клеток и эндотелиоцитов; CD133 — маркер плюрипотентных мезенхимных стволовых клеток; vWF — фактор фон Виллебранда; Flk-1 — рецептор2 к фактору роста эндотелия сосудов

Актуальность проблемы

В настоящее время наиболее распространенной моделью для изучения процессов васкуло- и ангиогенеза является 2D-культура поздних эндотелиальных прогениторных клеток на гелевом матриксе. При помещении на гель эндотелиальные прогениторные клетки мигрируют друг к другу, образуя кластеры, из которых в дальнейшем строят капилляроподобную сеть. Данную модель отличает простота, то есть использование лишь одного типа клеток, и легкость анализа новообразованных капилляроподобных структур, что позволяет проводить компьютерное моделирование данных процессов [10]. Главным недостатком данной модели является отсутствие просветов сосудов (люменов), свидетельствующее о незаконченности процесса.

Разработанная в нашей лаборатории методика помещения внутрь геля многоклеточного сфероида может стать новым подходом к моделированию образования полноценных кровеносных сосудов. Трехмерное культивирование клеток в виде сфероидов легко воспроизводит в лабораторных условиях микроокружение, схожее с тканями. При этом можно изменять состав клеток в сфероиде и регулировать влияние экзогенных факторов, таких как: включение циркулирующих клеток, воспалительные реакции, гормональные медиаторы и др. Таким образом, 3D-культура представляет собой более динамичную систему и удобную модель для исследования не только межклеточных взаимодействий, но и ангио- и васкулогенеза.

3D модели позволяют получить наиболее полное представление о механизмах образования кровеносных сосудов *in vitro*, что подводит к технологии безматриксного получения васкуляризованных микротканей. Кроме

того, индуцированные васкуляризованные сфероиды из ММСК могут служить источником получения эндотелиальных прогениторных клеток и клеток сопутствующего микроокружения. ММСК можно выделить из множества источников, включая костный мозг, жировую ткань, амниотическую жидкость, плаценту [5], пупочный канатик и пуповинную кровь. Данная культура обладает способностью к самообновлению и дифференцировке в нескольких направлениях: остеогенном, хондрогенном, адипогенном, эндотелиальном, мышечном, кардиогенном и нейрональном. Также было показано, что ММСК способны ускорять репарационные процессы в ишемизированной ткани за счет паракриной секреции ангиогенных цитокинов, включая VEGF, bFGF и PLGF. В нашей лаборатории были получены рыхлые и плотные сфероиды из стромы жировой ткани мыши [1], взрослого костного мозга и вартонова студня пупочного канатика человека [2]. Эти три ткани человека содержат значительные запасы васкулогенной стромы и незрелых эндотелиальных прогениторных клеток, что расширяет их васкуло-ангиогенный дифференцировочный потенциал [9, 11, 12, 16]. Данное исследование было направлено на изучение ангиогенного потенциала ММСК ПК и получение индуцированных в ангиогенном направлении 3D сфероидов, которые могут быть использованы как модель для анализа процессов васкуло- и ангиогенеза.

Материалы и методы

2D-культивирование ММСК ПК. Для получения гомогенной популяции ММСК ПК первичную диссоциированную культуру клонировали на чашках Петри в плотно-

сти 3–4 кл/см². Дальнейшее культивирование проводили в стандартных условиях (37°C; 5%CO₂) в полной ростовой среде DMEM/F12 (1:1, ПанЭко) с добавлением глутамина (2 мМ 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 перевели в условия 3D культивирования.

3D-культивирование ММСК ПК на агарозных планшетах. Для получения 3D-сфероидов ММСК ПК применяли 3D-культивирование в агарозных планшетах. Агарозные планшеты получали при полимеризации агарозы (Sigma) в специальных пластмассовых формочках (3D Petri Dishes, Microtissue, США). После полимеризации 256-луночные агарозные планшеты помещали в 12-луночные планшеты и заливали их суспензией диссоциированных клеток в 190 мкл среды, концентрация клеток в суспензии составляла 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 мМ L, ПанЭко), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко), ИТС (1:100, ПанЭко) (инсулин, трансферин, 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 в центрифужную пробирку (15 мл) и центрифугировали (5 мин, 600 об/мин, 60g). После удаления супернатанта, сфероиды размещали 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).

Проточная цитофлуориметрия. С помощью 0,25% раствора трипсина и раствора Версена получали суспензии диссоциированных клеток из 2D и 3D культуры и инкубировали их с антителами к CD11b, CD14, CD19, CD29, CD31, CD45, CD90, CD105 и CD133 (Beckman Coulter). Полученные результаты анализировали на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter, США) с помощью программы BD FACSDiva.

Фиксация сфероидов ММСК ПК. Для дальнейшего иммуногистохимического анализа сфероиды, предварительно очищенные от культуральной среды, фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 20 мин. Затем сфероиды помещали в 20% раствор глюкозы на 4 часа и готовили серию срезов толщиной 10–20 мкм на криотоме SM1850UV (Leica, Германия).

Для анализа полутонких срезов сфероиды фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом (1–2 ч, +25°C), дофиксировали 1% раствором OsO₄ (2 ч, +4°C). Далее проводили по ряду восходящих спиртов и обезвоживали в оксиде

пропилена. После инкубации в смеси оксида пропилена и аралдита (90 мин, +25°C) сфероиды переносили в аралдит (3 суток, 60°C). Серийные полутонкие и ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-111 (Швеция). Полутонкие срезы окрашивали смесью (1:1:1) 0,25% водного раствора крезидового фиолетового, 0,5% водного раствора толуидинового синего, 1% водного раствора метиленового синего и 1% раствора метилового зеленого (8–10 мин, 60°C).

Иммуноцитохимия. Срезы сфероидов инкубировали с первичными антителами к CD31, vWF, Flk-1, VEGF (Thermo Scientific), а затем с видоспецифичными вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами FITC и DyLight594 (Thermo Scientific). Ядра докрашивали флуоресцентным красителем бис-бензimid — Hoechst 33258 (Fluka). Полученные препараты анализировали при помощи лазерного конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV10I (Olympus, Япония).

Результаты и обсуждение

В 1979 г. Folkman выделил эндотелиальные клетки крысы, теленка и человека и показал возможность длительного культивирования этих клеток с поддержанием их эндотелиальных свойств [7] и способностью к васкулогенезу *in vitro* [8]. В 1997 г. Asahara впервые выделил эндотелиальные прогениторные клетки из периферической крови человека [3]. Было установлено, что данные клетки, экспрессирующие CD31+/Flk-1+/VEGF+, способны участвовать в васкулогенезе *in vitro* — при помещении на матригель [4], и *in vivo* — при эндотелизации сосудистых протезов [13]. Изучение клеточных механизмов ангио- и васкулогенеза *in vivo* и *in vitro* позволило идентифицировать две субпопуляции эндотелиальных прогениторных клеток: «ранние» эндотелиальные прогениторные клетки (CD133+/CD34+/VEGF+ клетки) и «поздние» эндотелиальные прогениторные клетки (CD31+/Flk-1+/vWF+ клетки) [15]. Было показано, что введение поздних эндотелиальных прогениторных клеток увеличивает реваскуляризацию ишемических зон ткани за счет взаимодействий ранних и поздних субпопуляций [14]. Однако ранние эндотелиальные прогениторные клетки практически не способны к самостоятельному образованию кровеносной сети.

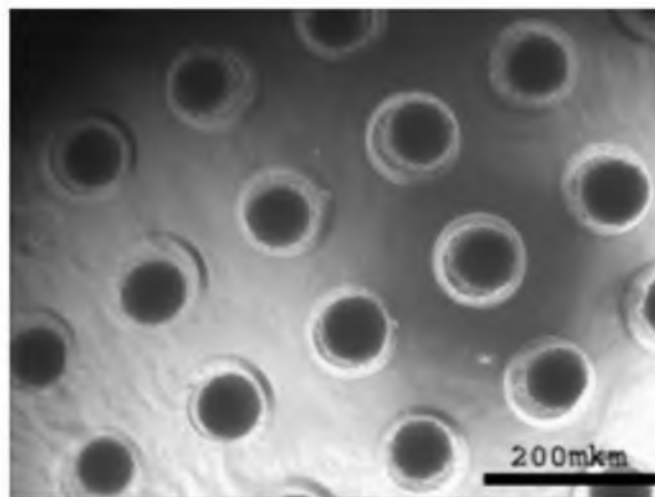


Рис. 1. Получение сфероидов ММСК ПК на агарозных планшетах. 7-е сутки

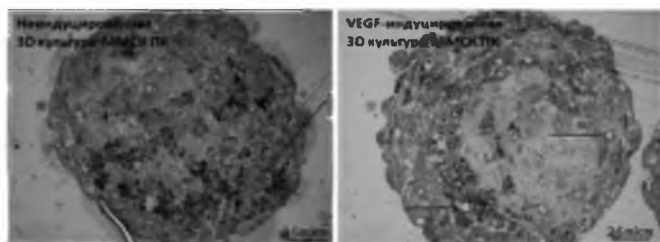


Рис. 2. Вакуолизация VEGF-индуцированной культуры ММСК ПК и образование 3D-люменов (черные стрелки). Световая микроскопия, гистологический анализ

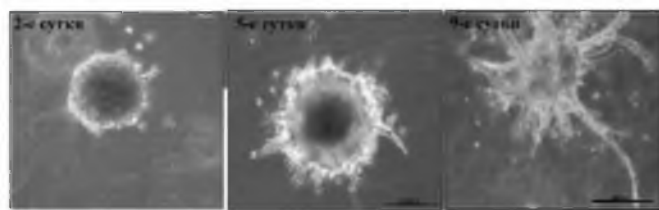


Рис. 3. Формирование примитивной капилляроподобной сети из сфероида ММСК ПК в матрикеле

В результате 3D-культивирования на 7-е сутки на агарозных планшетах из 2D-гомогенной культуры ММСК ПК были получены плотные жизнеспособные сфероиды — мезеносфероиды (рис. 1).

Сравнительный анализ иммунофенотипического профиля 2D и 3D культур ММСК ПК выявил увеличение числа CD34+, CD133+ ранних эндотелиальных прогениторных клеток при 3D-культивировании (таблица). Спонтанное новообразование ранних эндотелиальных прогениторов в мезеносфероиде может быть связано с 3D-репрограммированием мультипотентных клеток, вызванным особенностями строения сфероидов. Полученный результат свидетельствует о предрасположенности клеток в составе мезеносфероиде к эндотелиальной дифференцировке.

Однако ранние эндотелиальные прогениторы не способны к самостоятельному образованию сосудов и нуждаются в дополнительной индукции. В качестве индукционного агента был выбран фактор роста эндотелия сосудов — VEGF (vascular endothelial growth factor), который играет ключевую роль в процессах васкуло- и ангиогенеза и обеспечивает как дифференцировку и созревание эндотелиальных прогениторных клеток, так и их миграцию и рост сосуда. На 7-е сутки 3D-культивирования ММСК ПК в индукционной среде в сфероиде появлялись CD31+/vWF+/Flk-1+/VEGF+ ЭП. В васкуляризованных сфероиде было выявлено повышенное содержание вакуолей и 3D-люменов (рис. 2), формирование лю-

менов происходило за счет CD31+ клеток. Таким образом, мы показали, что VEGF является эффективным стимулятором эндотелиальных прогениторов и в условиях 3D-культуры ММСК ПК нами были разделены стадии образования ранних и поздних ЭП. Формирование 3D-люменов внутри сфероидов позволяет использовать эту клеточную модель для изучения васкулогенеза в условиях, приближенных к нативной ткани.

Кроме того, 3D-культура ММСК ПК позволяет изучать не только образование капилляроподобных структур внутри микроткани, но и дальнейший их рост в геле. Образование капилляроподобных структур в матрикеле является оптимальным функциональным тестом на способность клеток к ангиогенезу [6]. После помещения васкуляризованных сфероидов в матрикель, в первые сутки культивирования наблюдали деградацию матрикса вокруг сфероидов. На вторые сутки выявили направленную миграцию клеток, формирующих тяж вслед за ведущей клеткой. На 5-е сутки культивирования количество тяжей увеличивалось, наблюдали их ветвление, к 9-м суткам — клетки сфероидов формировали разветвленный плексус (рис. 3).

Таким образом, 3D-культура ММСК ПК является уникальной системой для моделирования процессов васкуло- и ангиогенеза *in vitro*, позволяющей исследовать не только новообразованные тубулы внутри геля, но и процессы формирования капилляров и их просветов, в максимально приближенных к нативным условиям.

Таблица

Сравнительный иммунофенотипический анализ экспрессии поверхностных маркеров клонированных 2D-культур и 3D-культур ММСК ПК

Анализируемые маркеры	Уровень экспрессии		Клетки-мишени
	Клонированная 2D-культура	3D-культура	
	ММСК ПК Пассаж 4	ММСК ПК 7 день	
Isotype IgG	0,523%	0,184%	Автофлуоресценция
CD11b-	5,743%	0,024%	Лейкоциты
CD14-	2,439%	0,562%	Моноциты
CD19-	5,702%	3,256%	В-лимфоциты
CD45-	0,111%	0,090%	Лейкоциты
CD29+	95,330%	99,870%	ММСК
CD90+	98,907%	58,136%	ММСК
CD105+	93,423%	85,892%	ММСК
CD34+	4,384%	17,921%	ЭП
CD133+	3,435%	26,341%	ЭП

Список литературы

1. Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Сабурин И.Н. Получение сфероидов из стромальных клеток подкожной жировой ткани мыши в условиях 3D культивирования // Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты: Тез. докл. III конф. — М. — ИБР РАН. — 2011. — С. 32-33.
2. Сабурин И.Н., Горкун А.А., Кошелева Н.В., Семенова М.Л., Пулин А.А., Репин В.С. Сопоставление поведения стромальных клеток пупочного канатика и мультипотентных стромальных клеток взрослого костного мозга в 2-D и 3-D культуре: моделирование стромальной регенерации // Вестник новых медицинских технологий. — 2009. — Т. 16, №4. — С. 9-11.
3. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., and Isner J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // Science. — 1997. — №275. — P. 964-967.
4. Asahara T., Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2004. — Vol. 287, №3. — P. 572-579.
5. Baal N., Widmer-Teske R., McKinnon T., Preissner K.T., Zygmunt M.T. In vitro spheroid model of placental vasculogenesis: does it work? // Lab. Invest. — 2009. — Vol. 89, №2. — P. 152-163.
6. Cole R.W., Liu F., Herron B.J. Imaging of angiogenesis: past, present and future // Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. — 2010. — Vol. 2, №4. — P. 885-896.
7. Folkman J., Haudenschild C., Zetter B.R. Long-term culture of capillary endothelial cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76, №1. — P. 5217-21.
8. Folkman J., Haudenschild C. Angiogenesis in vitro // Nature. — 1980. — Vol. 288, №5791. — P. 551-556.
9. Janovski M., Lukomska B., Domanska Janik K. Migratory capabilities of human umbilical cord neural stem cells in vitro // Acta Neurobiol. Exp. — 2011. — №71. — P. 24-35.
10. Merks R.M., Perryn E.D., Shirinifard A., Glazier J.A. Contact-inhibited chemotaxis in de novo and sprouting blood-vessel growth [Электронный ресурс]: научный журн. — PLoS Comput. Biol. — 2008. — Vol. 4, №9. — URL: <http://www.plosone.org>.
11. Pacini S., Cornicelli V., Trombi L., Montali M., Fazzi R., Lazarini E., Giannotti S., Petrini M. Constitutive expression of pluripotency associated genes in mesodermal progenitor cells [Электронный ресурс]: научный журн. — PLoS One. — 2010. — Vol. 5, №3. — URL: <http://www.plosone.org>.
12. Palpaut N.J., Metzger J.M. Astatic cardiology: adipose-derived cells for myocardial repair // Curr. Stem Res. Ther. — 2010. — №5. — P. 145-152.
13. Shi Q., Rafii S., Wu M.H., Wijelath E.S., Yu C., Ishida A., Fujita Y., Kothari S., Mohle R., Sauvage L.R., Moore M.A., Storb R.F., Hammond W.P. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells // Blood. — 1998. — Vol. 92, №2. — P. 362-3627.
14. Sieveking D.P., Buckle A., Celermajer D.S., Ng M.K. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay // J. Am. Coll. Cardiol. — 2008. — Vol. 51, №6. — P. 660-668.
15. Timmermans F., Van Hauwermeiren F., De Smedt M., Raedt R., Plasschaert F., De Buyzere M.L., Gillebert T.C., Plum J., Vandekerckhove B. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2007. — Vol. 27, №7. — P. 1572-1579.
16. Walls J.R., Coultas L., Rossant J., Henkelman R.M. Three-dimensional analysis of vascular development in the mouse embryo [Электронный ресурс]: научный журн. — PLoS One. — 2008. — Vol. 3, №8. — URL: <http://www.plosone.org>.

Research of angiogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells

Saburina i.N.^{1,2}, Gorkun A.A.¹, Zurina i.M.¹, Kosheleva N.V.^{1,3}, Repin B.C.^{1,2}

¹ — FSBI «Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,» Russian Academy of Medical Sciences, 125315, Moscow

² — GBOU SPE Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 123995, Moscow

³ — Moscow State University named M.V. Lomonosov, Moscow

To study the angiogenic potential of cell cultures a new 3D model of using the VEGF-induced spheroids from umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells (UC MMSC) was elaborated. It was shown that in the process of forming spheroids UC MMSC the number of early endothelial progenitor cells expressing CD34+, CD133+ increased as compared with 2D culture. The expression of markers of late endothelial progenitor cells (CD31+/vWF+/Flk-1+/VEGF+) was induced by VEGF. After transfer into Matrigel in spheroids the formation tubular like structures were discovered.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, angiogenesis, endothelial progenitor cells, Matrigel