

В.А. ШАБЛІЙ<sup>1,2</sup>, М.Д. КУЧМА<sup>2</sup>,  
В.М. КИРИК<sup>3</sup>, Г.С. ЛОБИНЦЕВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

<sup>2</sup> Інститут клітинної терапії, Київ

<sup>3</sup> ДП «Інститут генетичної та регенеративної медицини  
НАМН України», Київ

E-mail: v\_shabliy@ukr.net

## ЗБЕРЕЖЕННЯ ПАРЕНХІМАЛЬНИХ ТА СТРОМАЛЬНИХ ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ



*Показано присутність життєздатної популяції гепатобластів, епітеліальних бластних, ендотеліальних та мезенхімальних клітин в кріоконсервованій суспензії клітин фетальної печінки (ФП) людини. Виявлено епітеліально-мезенхімальну трансформацію гепатобластів у культурі клітин. Показано можливість використання раніше розробленого режиму кріоконсервування гемопоетичних клітин ФП першого триместру гестації для збереження гетерогенної популяції паренхімних та стромальних клітин.*

© В.А. ШАБЛІЙ, М.Д. КУЧМА, В.М. КИРИК,  
Г.С. ЛОБИНЦЕВА, 2012

**Вступ.** Технологія кріоконсервування фетальної печінки людини була розроблена для збереження гемопоетичних стовбурових клітин з метою їхнього подальшого використання в клінічній практиці [1]. Критерієм ефективності методу кріоконсервування суспензії клітин фетальної печінки людини (КФПЛ) було збереження колонієутворюючих одиниць гранулоцито- та моноцитопоезу (КУО-ГМ) при культивуванні в рідкому агарі. Режим кріоконсервування з 5 % ДМСО при використанні триступінчатої програми охолодження дає змогу зберегти 90 % КУО-ГМ [2].

З літературних джерел відомо, що ФП містить гемопоетичні [3], мезенхімальні стовбурові клітини [4], мезенхімально-епітеліальні прогеніторні клітини Іто [5] та клітини попередники гепатоцитів і холангіоцитів [6]. Однак збереження клітинного різноманіття в кріоконсервованій суспензії клітин ФП не доведено. Отже, метою даного дослідження було оцінити збереження паренхімних та стромальних попередників фетальної печінки людини першого триместру гестації при використанні методики кріоконсервування, яка застосовується для гемопоетичних клітин фетальної печінки.

**Матеріали та методи.** Джерелом фетальної печінки були абортівні ембріони людини 5–12 тиж гестації, отримані в результаті добровільного переривання вагітності з інформованої згоди жінок. Дослідження були схвалені біомедичним комітетом та Координаційною радою з трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України [7].

Пренатальна діагностика інфекцій включала визначення в крові жінок антигена вірусу гепатиту В, антитіл проти вірусу гепатиту С, ВІЛ 1 і ВІЛ 2 та збудника сифілісу.

Суспензію клітин ФП отримували ферментативним методом, шляхом обробки у гомогенізаторі Потера в розчині Хенкса з подальшим фільтруванням через клітинний фільтр з діаметром пор 100 мкм («Milipore», США). Кріоконсервування суспензії клітин печінки проводили за триетапною програмою, використовуючи методику Лобинцевої [8], при розробці якої критерієм

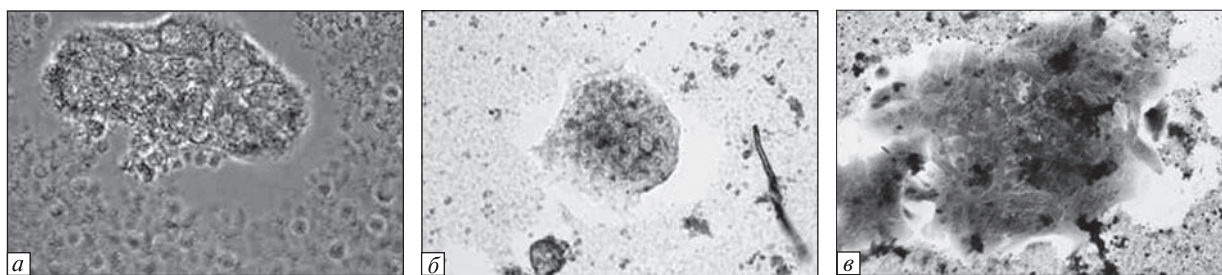


Рис. 1. Колонії клітин в культуральному середовищі без FBS: а – на 3-тю добу росту; б – на 10-ту добу росту; в – на 14-ту добу росту. Світлова мікроскопія, зб. а –  $\times 400$ ; б, в –  $\times 100$

ефективності було визначено порівняння кількості КУО-ГМ до та після криоконсервування. Зберігали заморожені зразки в рідкому азоті при температурі  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  в криоховищі «38Kw/Kryos Controleg».

Клітини ФП після розморожування висівали в концентраціях  $5 \cdot 10^4/\text{cm}^2$  та  $6 \cdot 10^5/\text{cm}^2$  у 60-мм культуральні чашки («Sarstedt», США), що були покриті колагеном I типу («Gibco», Німеччина), та у чашки без покриття. Культивування проводили в різних ростових середовищах: AIMV («Gibco», Німеччина); AIMV з додаванням 10 % фетальної сироватки корів (FBS) («Gibco», Німеччина); DMEM («Sigma», США) з додаванням 15 % FBS в умовах  $\text{CO}_2$ -інкубатора при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  та 5 %  $\text{CO}_2$ . Середовище замінювали кожні три доби протягом 1–3 тиж. Культуру МСК доводили до 4-го пасажу, знімаючи клітини з культурального посуду при пересіві за допомогою 0,05%-ного розчину трипсину з додаванням ЕДТА («Biochrom AG», Німеччина).

Імунофенотипування суспензії клітин здійснювали методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл, кон'югованих з флуорохромами («Becton Dickinson», США) в робочій концентрації 0,5 мкг на  $10^6$  клітин: anti-CD34 APC, anti-CD90 FITC, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD105 PerCP-Cy 5.5, anti-CD73 PE, anti-CD14 Pacific Blue. Фенотипування проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria («Becton Dickinson», США) за допомогою програми FACS Diva 6.1, аналізуючи одночасно два параметри світлорозсіювання та шість параметрів флуорес-

ценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів при багатопараметричному 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 (fluorescence minus one control).

Для проведення імуноцитохімічного аналізу клітини висівали в чотирилунокові планшети площею  $1,9\text{ cm}^2/\text{луноку}$  («Nunclon™Δ Surface»), фіксували 10%-ним розчином параформу на фосфатному буфері. Ендогенну пероксидазну активність інгібували 0,3%-ним розчином  $\text{H}_2\text{O}_2$  протягом 5 хв. Перед нанесенням антитіл фіксовані препарати обробляли 0,1%-ним розчином Triton X-100. Інкубували з первинними антитілами проти цитокератину 18 (СК 18) («Dako», Данія), віментину («DBS», США), CD56 («DBS», США) та проводили візуалізацію з використанням Mouse/Rabbit PolyVue HPR/DAB Detection System («DBS», США).

**Результати досліджень.** При використанні середовища AIM-V та культуральних флаконів, покритих колагеном, вже на 3-тю добу після посіву виявляли колонії, які містили невелику кількість клітин (рис. 1, а).

Протягом 10 днів виростили багаточарові колонії (до 100 клітин), нижній шар клітин мав епітеліальну морфологію, верхній – бластоподібну (рис. 1, б). В міру росту колонії ми спостерігали міграцію клітин верхнього шару на пластик з набуттям ними полігональної епітеліальної форми (рис. 1, в). З часом, після 12-ї доби культивування,

багат шаровість колоній зникала, і більшість клітин мали епітеліальну полігональну морфологію з великим ядром та чітко видимими ядерцями. Цитоплазма цих клітин була гранулярна, деякі клітини утворювали довгі тонкі вирости та трубчасті міжклітинні контакти (рис. 2).

За допомогою імуноцитохімічного аналізу отриманих колоній встановлено, що клітини експресували СК 18, віментин та були негативні за маркером CD56 (рис. 3). Враховуючи фенотипічний профіль, можна припустити, що ці клітини подібні до гепатобластів, які мають ознаки епітеліально-мезенхімальної трансформації (ЕМТ).

При культивуванні КФПЛ в середовищі з FBS на культуральному пластику спостерігався ріст компактних бластних клітин у вигляді дуже щільних колоній. При довготривалому культивуванні ці клітини утворювали багат шарові колонії, але на колагені вони росли моношаром, мали полігональну форму та гранулярну цитоплазму і були позитивні на цитокератин 18, що свідчить про їхній епітеліальний фенотип (рис. 4).

При великій щільності посіву клітин ФП ( $1 \cdot 10^6$  клітин на  $1 \text{ cm}^2$ ) в середовищі DMEM/FBS на 14-й день культивування виявляли фібробластоподібні клітини, які протягом семи днів утворювали моношар (рис. 5). Цитофлуорометричний аналіз культури клітин на другому пасажі продемонстрував, що близько 90 % клітин мали фенотип MCK а саме  $CD105^+CD73^+CD90^+CD45^-CD34^-CD14^-$ , тоді як 3 % клітин були представлені

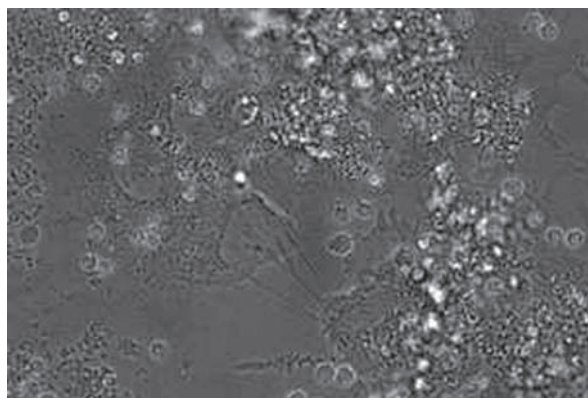


Рис. 2. Клітини ФП, що утворюють трубчасті міжклітинні контакти. Світлова мікроскопія, зб.  $\times 400$

ендотеліальними прогеніторними клітинами з маркерним профілем  $CD34^+CD73^+CD90^+CD45^-$  (рис. 6).

**Обговорення одержаних даних.** Тип клітин, отриманих з ФП, особливості їхнього росту та формування ними колоній багато в чому залежать від умов культивування. Так, при культивуванні КФПЛ в різних умовах ми отримали ріст гепатобластів, епітеліальних бластних, мезенхімальних та ендотеліальних клітин.

Імуноцитохімічний аналіз культури епітеліальних клітин показав присутність віментину та СК 18 в 90 % клітин (рис. 3, а, б). Наявність такого фенотипу отриманої культури клітин ( $\text{віментин}^+ \text{СК } 18^+$ ) може свідчити про ЕМТ паренхімних клітин печінки при культивуванні. Однак дане припущення потребує додаткових досліджень зміни процентного співвідношення цих маркерів у процесі культивування. В роботі

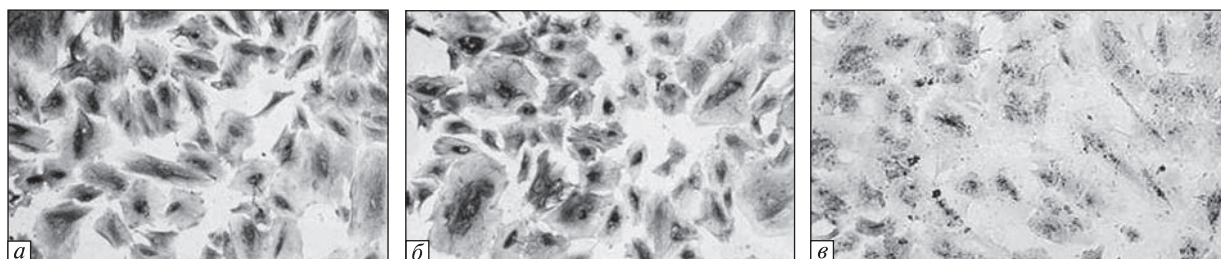
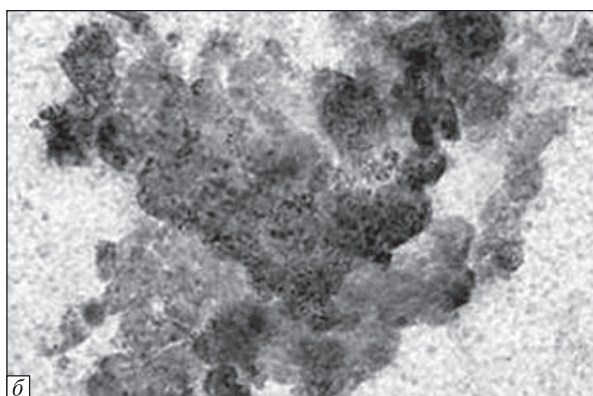
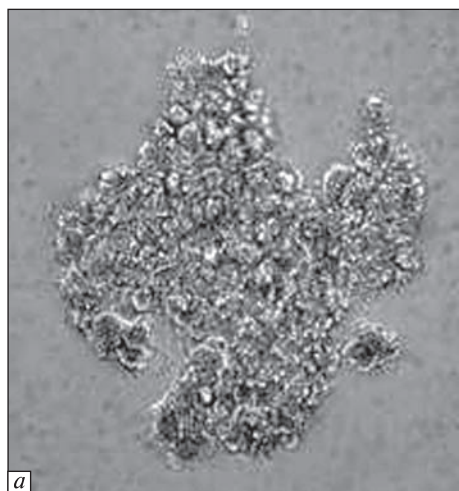
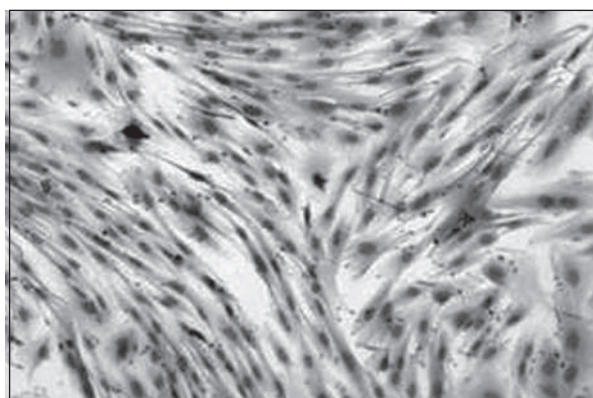


Рис. 3. Клітини ФП на 9-ту добу росту: а – імуноцитохімічне виявлення СК 18; б – імуноцитохімічне виявлення віментину; в – імуноцитохімічне дослідження демонструє відсутність CD56. Світлова мікроскопія, зб.  $\times 100$





**Рис. 4.** Колонії епітеліальних бластних клітин (а) та імуноцитохімічне виявлення СК 18 в епітеліальних бластних клітинах на 10-ту добу росту (б). Світлова мікроскопія, зб.  $\times 400$



**Рис. 5.** Фібробластоподібні клітини в середовищі DMEM/FBS, 21-ша доба культивування. Фарбування за Романовським. Світлова мікроскопія, зб.  $\times 100$

Masson et al. [9] показано, що 99,4 % клітин після семи днів культивування експресують віментин та 69 % – СК 18, що вказує на присутність значної кількості СК 18<sup>+</sup>віментин<sup>+</sup> клітин.

Схожі результати були отримані при культивуванні клітин підшлункової залози в неадгезивних умовах, де вони здатні були утворювати сфероїди [10]. Однак при зміні умов культивування з неадгезивних на адгезивні (пересів на адгезивний пластик) ці клітини утворювали моношар проліферуючих клітин (2D культура), частина з яких характеризувалася експресією як епітеліальних (цитокератин 7 та 19), так і мезенхімальних (віментин,  $\alpha$ -актин гладеньких м'язів) маркерів. Крім того, спостерігалася зміна експресії E-кадгерину на N-кадгерин та ініціація синтезу транскрипційного фактора Snail1, що, як відомо, вказує на ЕМТ клітин. Частина цих клітин також характеризувалася експресією білків віментину та глюкагону.

Разом з тим відомо, що мезенхімальні клітини печінки Іто при культивуванні в середовищі без FBS набувають епітеліальної морфології та експресують цитокератини. До того ж фетальні та дорослі клітини Іто експресують нейтральні молекули адгезії (CD56).

Нами показано, що CD56 (рис. 3, в) експресувався лише в деяких епітеліальних полігональних клітинах, тому фенотип отриманої культури клітин СК 18<sup>+</sup>віментин<sup>+</sup> та CD56<sup>-</sup> свідчить, що вони не належать до клітин Іто.

Доказами того, що ендодермальні епітеліальні клітини експресують віментин, є дані, наведені в роботі [9], де показано співекспресію віментину з СК 18 та СК 19 в епітеліальних клітинах жовчних протоків фетальної печінки та протоків підшлункової залози. В інших роботах встановлено, що пресинусоїдальні клітини та гепатобласти фетальної печінки людини 4–7 тиж гестації експресують як СК 18, СК 19, так і десмін. На більш пізніх стадіях експресія десміна спостерігається лише в клітинах стінок судин. Встановлений факт експресії синусо-

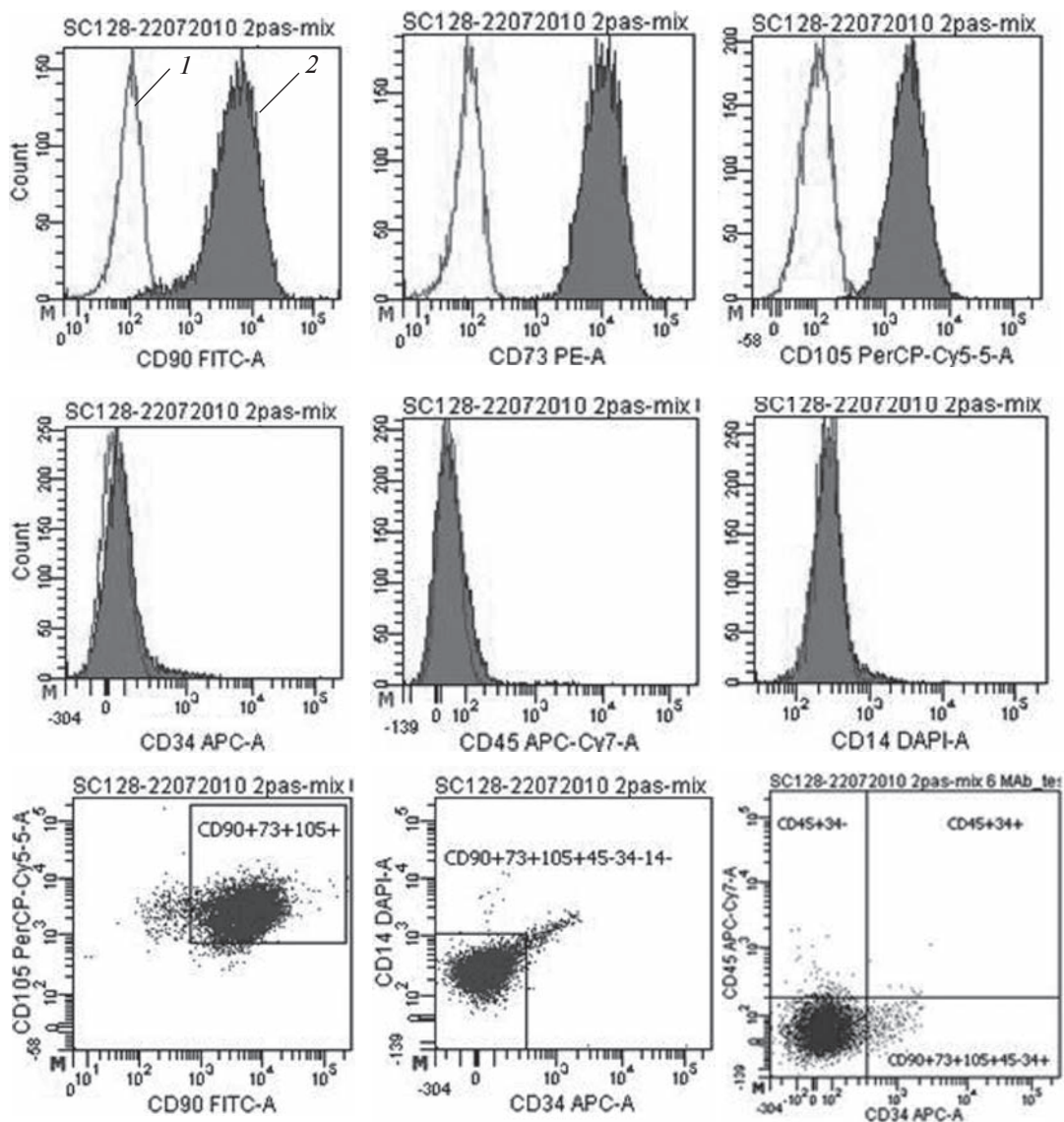


Рис. 6. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD14 та їхніх комбінацій в культурі клітин: 1 – початковий рівень флуоресценції суспензії клітин, 2 – рівень флуоресценції у зразку з додаванням моноклональних антитіл

їдальними клітинами печінки цитокератинів, а гепатоцитами – десміна в одні і ті ж терміни гестації вказує на їхнє спільне походження [11].

Звищенаведеного впливає, що при культивуванні КФПЛ нами було отримано ріст епітеліальних полігональних клітин з експресією СК 18, віментину та з відсутністю експресії CD56.

В роботі Schmelzer et al. [12] було показано, що колонії прогеніторних печінкових клітин мають фенотип альбумін<sup>+</sup>, СК 18<sup>+</sup>, СК 19<sup>+</sup>, CD44Н<sup>+</sup>, CD133/1<sup>+</sup>, CD56 (NCAM)<sup>+</sup>, та на периферії колоній експресуються маркери мезенхімальних клітин. При відокремленні печінкових прогеніторних клітин від мезенхімальних за допомогою магнітного сортигу клітин за ЕрСМ вони втрачають здат-

ність прикріплюватися до пластику та продовжують рости тільки на фідері з клітин лінії ембріональних мишачих фібробластів STO [12].

Можна припустити, що наявність десміну,  $\alpha$ -актину гладеньких м'язів та інших мезенхімальних маркерів може вказувати на ЕМТ прогеніторних клітин печінки на периферії колонії. Однак присутність VEGF $\alpha$  та KDR, CD133/1, CD117, фактора Віллебранда, CD31 weak та CD146 свідчить про мезодермально-ендодермальну структуру колоній з мезенхімальними клітинами Іто та ангиобластами [13]. З цього випливає, що при культивуванні клітин ФП формуються гетерогенні ендодермально мезенхімальні колонії, хоча не виключається і епітеліально-мезенхімальна трансформація прогеніторних клітин печінки.

Щільні колонії, які містили епітеліальні бластоподібні, гранулярні клітини (рис. 4), можуть мати ендодермальне походження та бути утворені печінковими прогеніторними клітинами. З літературних даних відомо, що колонії компактних бластних клітин, які виростили з ФП людини, мають маркери ендотеліальних прогеніторних клітин, мезенхімальних та прогеніторних печінкових клітин. Клітини, що формують ці колонії, мають здатність до диференціювання в остеогенному, адипогенному, хондрогенному, гепатогенному та ендотеліальному напрямках при культивуванні в індуктивних середовищах, тому їх відносять до печінково-мезенхімальних прогеніторних клітин.

Нами також було отримано культуру фібробластоподібних клітин (рис. 5), які на основі їхніх фенотипових характеристик (рис. 6) можна віднести до мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин. Але це ствердження потребує додаткових досліджень на мультипотентність, хоча існує багато робіт, в яких описано потенціал до мультилінійного диференціювання мезенхімальних клітин, отриманих з фетальної печінки [14]. Потрібно зазначити, що мінорна популяція цієї культури була представлена ендотеліальними прогеніторними клітинами.

Отже, при використанні селективних умов культивування КФПЛ нами було отримано ріст гепатобластів, епітеліальних бластних та фібробластоподібних клітин.

**Висновки.** Застосування програми кріоконсервування клітин ФП, яка використовується для збереження популяції гемопоетичних клітин, дозволяє також зберегти клітини іншого типу з різними характеристиками, які в культурі дають ріст гепатобластів, епітеліальних бластних, ендотеліальних та мезенхімальних клітин. Оскільки кількість колоній КУО-ГМ вибрано як критерій ефективності кріоконсервування за даною програмою, цей показник також може бути використаний для оцінки виживання та можливого переважання в культурі певних типів стромальних клітин.

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

#### PRESERVATION OF PARENCHYMAL AND STROMAL PROGENITORS IN CRYOPRESERVED HUMAN FETAL LIVER

In this paper we show presents of viable population of hepatoblasts, endodermal blasts, endothelial and mesenchymal cells in the cryopreserved suspension cells of human fetal liver. Also we observed epithelial-mesenchymal transition of hepatoblasts in culture. We show that it's possible to apply the method of cryopreservation of hematopoietic cells of human fetal liver of the first gestation trimester for cryopreservation of parenchymal and stromal cells of fetal liver.

*V.A. Шаблій, М.Д. Кучма,  
В.М. Кирик, Г.С. Лобинцева*

#### СОХРАНЕНИЕ ПАРЕНХИМАЛЬНЫХ И СТРОМАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

В работе показано присутствие жизнеспособной популяции гепатобластов, эпителиальных бластных, эндотелиальных и мезенхимальных клеток в кріоконсервированной суспензии клеток фетальной печени (ФП) человека. Установлено, что в культуре клеток проходит эпителиально-мезенхимальная трансформация гепатобластов. Показана возможность использования ранее разработанного режима кріоконсервирования гемопоэтических клеток ФП первого триместра гестации для сохранения гетерогенной популяции паренхимных и стромальных клеток.



СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Грищенко В.І., Лобинцева Г.С., Вотякова А.І. та ін. Гемопоетичні клітини ембріональної печінки (ембріогенез, трансплантація, криоконсервування). — Київ, 1988. — 250 с.
2. Пат. 2233589 Российская Федерация. Способ криоконсервирования гемопоэтических клеток человека / Лобинцева Г.С. — 2004. — Бюл. 22.
3. Lim F.T.H., Kanhai H.H., Falkenburg J.H.F. Characterization of the human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cell compartment during the second trimester of pregnancy // Hematol. J. — 2005. — **90**, № 2. — P. 173–179.
4. Gotherstrom C., West A., Liden J. et al. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells // Hematol. J. — 2005. — **90**, № 8. — P. 1017–1026.
5. Гумерова А.А., Киясов А.П., Калигин М.С. и др. Участие клеток Ито в гистогенезе и регенерации печени // Клет. трансплантология и ткан. инженерия. — 2007. — **2**, № 4. — С. 39–46.
6. Weiss T.S., Lichtenauer M., Kirchner S. et al. Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation // Hepatology. — 2008. — **57**. — P. 1129–1138.
7. Наказ МОЗ № 81 від 12.05.1992 р., № 147 від 19.08.2004 р., № 66 від 13.02.2006 р., № 630 від 10.10.2007 р.
8. Пат. (11) 46673 А, Україна. Спосіб консервування гемопоетичних клітин людини / Лобинцева Г.С. Заявл. 15.05.2002. Бюл. № 5.
9. Masson N.M., Currie I.S., Terrace J.D. et al. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1 // Amer. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. — 2006. — **291**. — P. 45–54.
10. Fanjul M., Gmyr V., Sengenès C. et al. Evidence for epithelial–mesenchymal transition in adult human pancreatic exocrine cells // J. Histochem. and Cytochem. — 2010. — **58**, № 9. — P. 807–823.
11. Гумерова А.А., Киясов А.П. Могут ли перисинусоидальные клетки быть региональными стволовыми (прогениторными) клетками печени? // Клет. трансплантология и ткан. инженерия. — 2010. — **5**, № 1. — С. 33–40.
12. Schmelzer E., Zhang L., Bruce A. et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors // J. Exp. Med. — 2007. — **204**, № 8. — P. 1973–1987.
13. Dan Y. Y., Riehle K. J., Lazaro C. et al. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2006. — **103**, № 26. — P. 9912–9917.
14. Choua S., Lodisha H.F. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2010. — **107**, № 17. — P. 7799–7804.

Надійшла 17.02.11