

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ИЗ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЛАКУНАРНЫМИ ИНФАРКТАМИ МОЗГА ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ МИКРОАНГИОПАТИИ

И.Н. Северин¹, Н.В. Гончарова¹, Л.Н. Анацкая², Г.Я. Хулун¹

¹Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий;

²Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии

Наличие эндотелиальных клеток-предшественников (ЭКП), их роль в ангиогенезе [1] и неоваскулогенезе [2] была продемонстрирована группой Asahara Т. с соавт. в 1997 и 1999 гг. В 2000 г. Lin Y. с соавт. доложили о выявлении нового типа эндотелиальных клеток в крови, отрицательных по экспрессии гемопоэтических маркеров CD45 и CD133 [3]. Отличительной особенностью данного типа клеток является то, что их колонии появляются в первичной культуре не менее 12 дней спустя после высева на культуральный пластик, обработанный фибронектином, клеток мононуклеарной фракции (МНК) крови. В связи с этим колонии ЭКП по времени возникновения в первичной культуре делят на ранние и поздние. Ранние колонии содержат, предположительно, циркулирующие ЭКП, берущие начало, по некоторым сведениям, в популяции моноцитов [4]. Данная популяция ЭКП содержит клетки, положительные по гемопоэтическим маркерам CD45+, CD133+, CD14+ и не способные активно делиться в культуре *in vitro*. Поздние колонии содержат только активно делящиеся клетки с характерной эндотелиальной морфологией так называемой «бульжной мостовой». Данные клетки демонстрируют зависимость от присутствия в среде факторов роста фибробластов 1 или 2 типов (FGF-1 и FGF-2 соответственно) и эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF). Данный тип клеток не имеет CD45+CD14+ фенотипа, характеризуется экспрессией поверхностных маркеров CD31+KDR+CD144+CD34+, поддерживается в культуре *in vitro* при пересевах. Содержание циркулирующих в крови ЭКП может быть прогностическим маркером в ряде патофизиологических состояний [5].

Цель работы — изучение эффективности выделения поздних эндотелиальных клеток-предшественников при культивировании мононуклеарных клеток из крови пациентов с лакунарными инфарктами мозга (ЛИМ) при церебральной микроангиопатии (ЦМА) в первичной культуре.

Материал и методы. *Образцы крови пациентов.* Образцы периферической крови пациентов в остром периоде ЛИМ при церебральной микроангиопатии получены из РНПЦ неврологии и нейрохирургии» МЗ Ре-

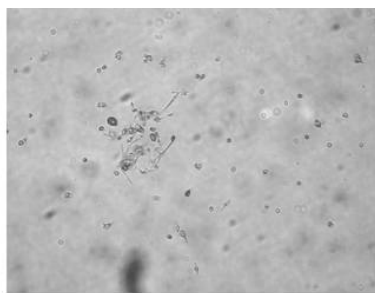
спублики Беларусь. Исследования проводились на основании решения Комитета по этике РНПЦ «Неврологии и нейрохирургии». Возраст пациентов на момент исследования составлял $59 \pm 4,3$ года (45–79 лет). Группу сравнения составили 5 здоровых доноров крови ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий».

Выделение фракции мононуклеарных клеток крови. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из крови пациентов по стандартной методике [6]. Отмытые клетки ресуспензировали в 0,5–2 мл раствора Хэнкса, производили подсчет концентрации МНК данной суспензии в камере Горяева.

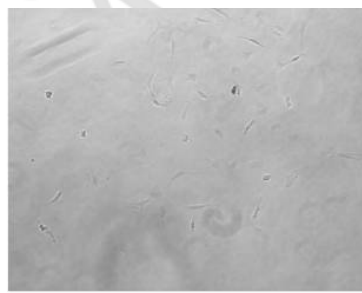
Культивирование клеток мононуклеарной фракции в первичной культуре. После подсчета в камере Горяева МНК осаждали центрифугированием при 1500 об./мин и комнатной температуре в течение 10 мин. Осадок клеток ресуспензировали в полноценной питательной среде (ППС) (MCDB131, 2% сыворотки крови человека группы АВ (IV), 10 нг/мл VEGF, 20 нг/мл FGF-2, 25 нг/мл EGF, 1 мкг/мл гидрокортизон-21-гемисукцината, 5 ед/мл гепарина) и высевали в культуральные сосуды с фибронектиновым покрытием. По истечении 3-х сут культуру отмывали раствором Хэнкса, заменяли среду. В дальнейшем среду меняли через день на протяжении 4–5 недель до появления колоний ЭКП. По достижении эндотелиальными клетками 70–80% конфлюэнтности производили субкультивирование. Клетки отмывали раствором Хэнкса и снимали с поверхности инкубацией с раствором 0,025% трипсин-ЭДТА при 37°C в течение 1–2 мин. Клетки ресуспензировали в свежей ППС и высевали в новый культуральный сосуд в соотношении 1:3–1:5.

Фенотипическая характеристика культур. Фенотип клеток определяли с помощью метода проточной цитометрии на присутствие поверхностных маркеров CD31, CD309, CD144, CD34, CD117, CD45, CD133, vWF соответствующими антителами по протоколу производителя антител.

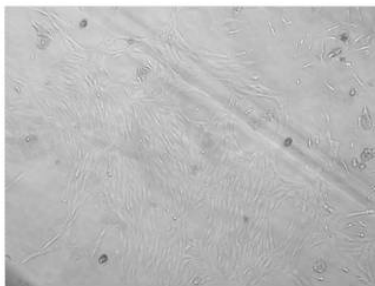
Результаты и их обсуждение. Первичные культуры в МНК крови пациентов с ЛИМ содержали невысокое количество прикрепившихся клеток с начала культивирования. Преобладали в основном клетки круглой формы с небольшим количеством клеток с фибробластидной морфологией (рисунок 1А).



А



Б



В

Рисунок 1 — Первичная культура эндотелиальных клеток: А — ранняя эндотелиальная колония, Б, В — колонии поздних эндотелиальных клеток

Степень конфлюэнтности не превышала 20%, образовывались редкие ранние колонии. К исходу второй недели культивирования ранние колонии ЭКП исчезали, в культурах появлялись поздние колонии, содержавшие только клетки с укороченной фибробластидной морфологией (рисунок 1Б). Количество ЭКП в составе колоний варьировало (рисунки 1Б–1В).

Количество поздних эндотелиальных колоний в пересчете на миллилитр крови (таблица) существенно не отличалось от такового в других исследованиях и составило $0,29 \pm 0,06$ колоний/мл. Колонии поздних ЭКП удалось выделить из 71,43% (пять из семи) образцов крови пациентов с ЛИМ.

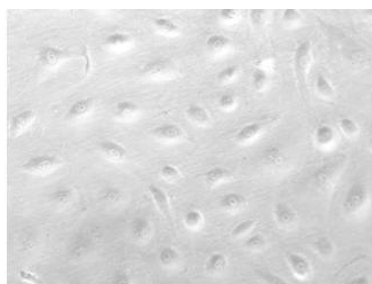
С момента обнаружения поздних колоний ЭКП в соответствующие культуры добавляли среду с 20%-м содержанием сыворотки (все остальные компоненты добавляли в прежних концентрациях). Клетки быстро пролиферировали, по достижении 30% конфлюэнтности колонии пересеивали и считали клетками I пассажа. При высевае в низкой концентрации ЭКП образовывали небольшое количество колоний, имевших в своем со-

стае незначительное количество клеток (3–4 клетки в колонии). В дальнейшем субкультивирование проводили с разведением 1:4–1:5. При таком разведении культуры ЭКП образовывали крупные колонии, впоследствии объединявшиеся в монослой за период не менее 1 недели. В монослой культуры ЭКП принимали характерную для данного типа клеток морфологию так называемой «булыжной мостовой» (рисунок 2).

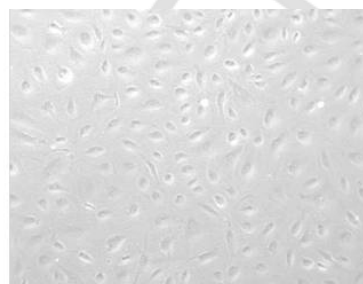
Таблица

Количество поздних колоний ЭКП в первичных культурах мононуклеарных клеток крови пациентов с ЛИМ при ЦМА

Образец первичной культуры	Количество колоний	Дни первичной культуры	Отношение количества колоний к начальному объему крови (колоний/мл крови)
1	5	16	0,31
2	5	10	0,33
3	3	10	0,2
4	5	7	0,29
5	6	14	0,36



А



Б

Рисунок 2 — Эндотелиальные клетки-предшественники IV пассажа с морфологией «булыжной мостовой»: А — объектив ×20, Б — объектив ×10

Имунофенотип поздних ЭКП характеризовался значительной выраженностью молекул CD34+ (80–100% позитивных клеток), CD31+ (99–100% позитивных клеток), CD117+ (64–97% позитивных клеток), CD144+ (99–100% позитивных клеток), KDR+ (98–99% позитивных клеток), невысокой экспрессией CD133+ (5–13% позитивных клеток), а также мембранно-связанного vWF+ (8-9% позитивных клеток) и отсутствием гемопоэтических маркеров CD45 и CD133 (0–0,15% позитивных клеток).

Заключение. Показаны наличие и частота встречаемости ЭКП в периферической крови пациентов с ЛИМ при ЦМА. Полученные культуры циркулирующих ЭКП пациентов с ЛИМ при ЦМА фенотипически и морфологически соответствуют ЭКП на различных стадиях созревания и демонстрируют экспрессию основных эндотелиальных маркеров. Частота выделения поздних ЭКП составила 71,43%. Содержание колоний поздних ЭКП составило $0,29 \pm 0,06$ колоний/мл крови.

ISOLATION OF LATE-OUTGROWTH ENDOTHELIAL CELLS FROM BLOOD OF PATIENTS WITH ACUTE LACUNAR STROKE IN COURSE OF CEREBRAL MICROANGIOPATHY

I.N. Seviaryn, N.V. Goncharova, L.N. Anatskaia, G.Ya. Khulup

The cultures of late-outgrowth endothelial cells from peripheral blood of patients with acute lacunar stroke were isolated. The cultures in question possessed high proliferative capacity, endothelial phenotype (CD31⁺ KDR⁺ CD34⁺ CD144⁺) and a characteristic “cobblestone” morphology upon confluence. The isolation was successful in 71.43% of cases (5 out of 7 blood samples). The incidence of late-outgrowth colonies was 0.29 ± 0.06 colonies per milliliter of blood in samples with successful isolation.

Field of application: biomedical research, cell biology, angiogenesis.

Литература

1. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / T. Asahara [et al.] // *Sci.* — 1997. — Vol. 275. — P. 964–967.
2. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization / T. Asahara [et al.] // *Circ. Res.* — 1999. — Vol. 85. — P. 221–228.

3. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood / Y. Lin [et al.] // J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 105. — P. 71–77.

4. Asahara, T. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine / T. Asahara, A. Kawamoto, H. Masuda // Stem. Cells. — 2011. — Vol. 29. — P. 1650–1655.

5. Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts / P.W. Rob [et al.] // Stroke. — 2008. — Vol. 39. — P. 2158–2165.

6. Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and sedimentation at 1 g / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 1968. — Vol. 21, № 97. — P. 82–92.