

Поиск оптимальных условий мобилизации и сохранения клеток фетальной печени человека

Д. А. Базыка, Н. В. Беляева, С. В. Васильовская¹, Л. Л. Лукаш¹,
И. А. Вотякова², О. А. Коваленко¹, Г. Х. Мацука¹

Научный центр радиационной медицины АМН Украины
Ул. Мельникова, 53, Киев, 04050, Украина

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

² Медицинский центр тканевой и клеточной терапии «Эмбриотек»
Ул. Верхняя, 4, Киев, 01133, Украина

С помощью иммунофенотипирования клеток эмбриональной печени при различных условиях клеточной мобилизации (вымывание клеток, трипсинизация или гомогенизация ткани) показано, что состав мембранных антигенов существенно не различается. Как и при изучении морфологии, клеточные образцы преимущественно были представлены клетками-предшественниками, коммитированными в эритроидном направлении (50–70 %), фенотип этих клеток: CD34^{+/low} CD117⁺ CD38⁺ HLA-DR^{+/low} CD90⁺ CD7^{+/low} CD45RO^{+/low} CD36⁺⁺⁺ CD71⁺⁺⁺ CD33⁺ CD13⁺ CD14^{+/low} CD61^{+/low}. Сравнительный анализ выявил, что объем «чистой» CD34⁺ популяции был наибольшим в образцах клеточных суспензий, где клетки выделяли трипсинизацией эмбриональной ткани и затем хранили в условиях криоконсервации в течение трех недель, а наименьшим — в образцах клеточных суспензий, полученных гомогенизацией ткани.

Введение. Основное препятствие широкого биотехнологического использования стволовых клеток (СК) — это ограниченная возможность поддержания функции этих клеток *in vitro* без потери долговременной способности к мультилинейному росту, что является необходимым условием их клинического использования [1]. Исследования, связанные с выбором наиболее подходящего источника получения СК, путей их накопления и сохранения для последующего применения в клинике, являются на сегодня наиболее актуальными [2, 3].

Разработка биотехнологий на основе популяций гемопоэтических клеток эмбриональной печени, обогащенных стволовыми клетками, для клинического использования, а также для тестирования различных препаратов [4–6] обусловила необходимость тщательного изучения влияния различных условий обработки на фенотип клеточных популяций.

Следует отметить, что в процессе эмбрионального развития человека и млекопитающих происходит естественная смена локализации кроветворения: первоначально оно осуществляется в желточном мешке, а затем перемещается в печень, селезенку и, наконец, в костный мозг за счет миграции и внедрения в новое микроокружение полипотентных СК. Клеточный состав кроветворной ткани существенно различается в зависимости от возраста эмбрионального материала [7]. Так, на начальных стадиях эмбрионального развития кроветворная ткань обогащена СК, а затем в ходе становления взрослого кроветворения их доля в популяции значительно снижается. Поэтому наиболее перспективно для получения гематогенных СК использовать раннюю эмбриональную ткань (например, печень 5–7-недельной гестации).

Помимо возрастных и индивидуальных генетических различий возможно изменение фенотипических характеристик клеточных популяций в результате гибели или преимущественного выживания и/или размножения того или иного типа

© Д. А. БАЗЫКА, Н. В. БЕЛЯЕВА, С. В. ВАСИЛОВСКАЯ,
Л. Л. ЛУКАШ, И. А. ВОТЯКОВА, О. А. КОВАЛЕНКО,
Г. Х. МАЦУКА, 2004

клеток на этапах первичной и последующих обработок эмбриональной ткани: дезагрегация, криоконсервирование, культивирование, трансформация и селекция клеток. Иммунофенотипические характеристики клеток эмбриональной печени после длительного хранения в криобанке [8] несколько меняются под влиянием условий замораживания и длительного хранения [9]. Существенным фактором для получения необходимой «чистой» фракции СК является поиск оптимальных способов обработки эмбрионального материала, условий мобилизации и сохранения клеточной массы, способствующих максимальному сохранению их свойств.

В настоящем сообщении приведены результаты оценки различных способов обработки эмбрионального материала, условий мобилизации и сохранения клеточной массы.

Материалы и методы. Объектом исследования служили клетки, выделенные из эмбриональной печени ранних сроков гестации (5—7 недель). Для этого использовали неповрежденный исходный материал, получаемый в результате операции искусственного прерывания беременности по медицинским показаниям. При определении возраста эмбрионов учитывали данные анамнеза, а также прижизненное определение возраста методом ультразвуковой эхолокации с помощью установки «Алока» (Япония). В условиях с соблюдением правил асептики извлекали печень, промывали ее трижды в среде DMEM («Sigma», США) с пенициллином и стрептомицином, разрезали печень на фрагменты, которые затем обрабатывали различными способами для получения взвеси дискретных клеток. После завершения процедуры клетки ресуспендировали в среде DMEM с 10 % эмбриональной сыворотки производства «БиотестЛаборатории» (Украина). Далее клеточные суспензии либо хранили при температуре 4 °С до проведения иммунофенотипирования, либо подвергали криоконсервированию по стандартной методике [10].

В каждом исследуемом случае каплю исходной клеточной суспензии помещали на чистое обезжиренное стекло и готовили мазки, которые высушивали на воздухе. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью окрашивания трипановым синим (0,3 %). Кроветворные клетки фиксировали на стекле с помощью метанола в течение 15 мин. Для проведения морфологических исследований окрашивание проводили азурэозином по Романовскому.

Количество ядросодержащих клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева после предварительного лизиса эритроцитов в 3 %-м растворе уксусной кислоты, содержащей 1 % красителя генцианвиолета.

Для исследования содержания клеток — предшественников грануломоноцитопоза (КОЕ-ГМ) исследовали клонообразование в полужидкой агаровой среде, приготовленной по стандартной методике [11].

Фенотипическую идентификацию клеток в образцах осуществляли методом проточной цитометрии на лазерном проточном цитофлуориметре FACScan («BD», США) с использованием прямых моноклональных антител, конъюгированных с PE, FITC, Per-CP.

Результаты и обсуждение. Печеночную ткань дезагрегировали с помощью трех различных способов. В одном случае кусок печени переносили в стеклянный гомогенизатор Поттера с 2 мл среды DMEM и пестиком осторожно раздавливали паренхиму органа до получения однородной массы. Клетки смывали со стенок и пестика, пропускали через систему фильтров с последующим пассажем через инъекционные иглы уменьшающегося диаметра. Во втором случае кусок органа подвергали мягкой ферментативной обработке с помощью смеси стандартных растворов трипсина (0,25 %) и версена (0,02 %) в соотношении 2:1. При этом клетки выдерживали в течение 1 ч в смеси трипсина и версена при 4 °С, затем отмывали дважды средой DMEM и суспендировали с помощью пипеток уменьшающегося диаметра. Эту методику мы применяли ранее при получении гепатоцитов из эмбриональной печени человека [12]. Кроме того, в отдельных экспериментах клетки вымывали из печени с помощью встряхивания в растворе Хэнкса. Во всех случаях по окончании процедуры клетки осаждали с помощью центрифугирования и ресуспендировали их в среде DMEM с 10 % сыворотки. Время от момента извлечения эмбрионального материала до завершения приготовления клеточной суспензии не превышало 4 ч. Все манипуляции с клетками осуществляли при комнатной температуре.

Жизнеспособность клеток печени, полученных ферментативным путем, составляла в среднем 92 %, после механической дезагрегации — 57 %. Эти показатели существенно зависели от состава транспортной среды, в которой перевозили эмбриональный материал, от температуры, длительности транспортировки, концентрации ферментов.

При проведении морфологических исследований в нативных образцах печени 5—6-недельного возраста обнаружено до 45 % примитивных эритробластов, отличающихся от дефинитивных эритробластов более крупными размерами, содержащих ядра и синтезирующих фетальный гемоглобин. В указанные сроки дефинитивные эритробласты со-

Влияние способа мобилизации и сохранения клеточной массы фетальной печени на состав клеточных популяций

Способ мобилизации (условия хранения)	Доля (%) более зрелых по мембранному фенотипу клеток в общей клеточной коллекции (5000 случаев) (M±σ)	
	CD34 ⁺ CD38 ⁺	CD34 ⁺ HLA-DR ⁺
Гомогенизация	9,93±12,15	1,87±2,08
Трипсинизация	6,42±4,93	1,65±0,82
Трипсинизация с последующим криоконсервированием в течение трех недель	15,03±7,50	2,37±1,00

Примечание. Представлены усредненные данные по трем образцам.

ставляли не более 14 %. На 7-й неделе, наблюдается тенденция к снижению количества примитивных (32 %) и возрастанию количества дефинитивных эритробластов (21 %).

При изучении других типов клеток не обнаружено существенных различий между образцами 5—7-недельного возраста. Примерно 20 % всей клеточной популяции — это моноциты и макрофаги. Недифференцируемые бластные клетки составляли до 17 %. Лимфоцитоподобные клетки встречались с частотой 4—6 %. В исследуемых выборках отмечены лишь единичные мегакариоциты, миелобласты и гранулоциты.

По нашим данным, процедура замораживания—оттаивания не влияла существенно на соотношение клеточных элементов эритро-, моно- и миелопоэза. Однако наблюдалась тенденция к увеличению количества недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных клеток за счет снижения процентного содержания макрофагов, что свидетельствует о чувствительности последних к температурным обработкам.

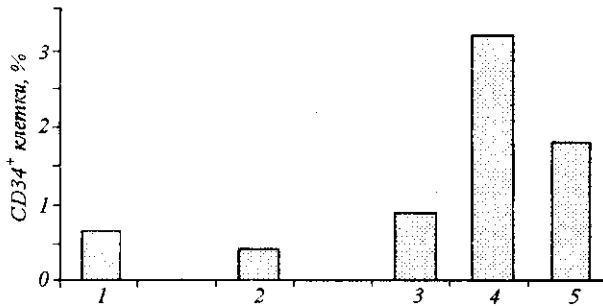
Из полученных нами данных следует, что количество ядросодержащих клеток в образцах печени 5—6-недельной гестации составляло $26 \cdot 10^6$. На 7-й неделе отмечено увеличение количества ядерных элементов крови более чем в 2 раза. Но при посеве в полужидкий агар ядросодержащих клеток, выделенных из эмбрионального материала в возрасте от 5 до 7 недель, частота клеток, способных к клонообразованию (КОЕ-ГМ), существенно не различалась и варьировала в пределах $(63—70) \cdot 10^5$.

Таким образом, популяции гемопоэтических клеток, выделенных из эмбриональной печени 5—7-недельного возраста, характеризуются большим количеством примитивных эритробластов, недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных элементов крови. В эти сроки внутриутробного развития в печени идут процессы активного эрит-

ропоэза, в то время как содержание миелоидных клеток минимально. Это, вероятно, связано с высоким спросом растущего организма на клетки красного ростка кроветворения, обеспечивающего дыхательную функцию эмбриона. Потребность же в гранулоцитарном ростке невелика, так как основные защитные реакции осуществляются клетками материнского организма.

После криоконсервирования наблюдалась тенденция к увеличению количества недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных клеток и к снижению количества зрелых элементов крови, макрофагов, что, по-видимому, связано с различной чувствительностью к действию низких температур.

Изучение мембранного фенотипа клеток эмбриональной печени при различных условиях клеточной мобилизации — вымывание клеток, трипсинизация или гомогенизация ткани — показало, что состав антигенов существенно не меняется. Как и при изучении морфологии, клеточные образцы были преимущественно представлены клетками-предшественниками, коммитированными в эритроидном направлении, что совпадает с ранее полученными данными [8, 13—14]. Эта клеточная фракция составляла 50—70 % и содержала клетки с фенотипом: CD34^{+/low} CD117⁺ CD38⁺ HLA-DR^{+/low} CD90⁺ CD7^{+/low} CD45RO^{+/low} CD36⁺⁺⁺ CD71⁺⁺⁺ CD33⁺ CD13⁺ CD14^{+/low} CD61^{+/low}. Вполне объяснимо то, что более высокий процент жизнеспособных клеток отмечен при использовании метода вымывания, однако при этом и процент эритроидных предшественников был максимальным. Сравнительный анализ показал, что объем «чистой» CD34⁺ популяции был наибольшим в образцах эмбриональной ткани, клетки из которой выделяли трипсинизацией и хранили в условиях криоконсервации в течение трех недель, а наименьшим (0,5 %) — в образцах, клеточные суспензии которых были получены гомогенизацией ткани непосредственно после обра-



Содержание (%) CD34⁺ клеток в образце эмбриональной печени (E17 — эмбрион семинедельного развития) в зависимости от условий клеточной мобилизации и сохранения: 1 — вымывание клеток; 2 — гомогенизация ткани; 3 — трипсинизация ткани; 4 — трипсинизация и криоконсервирование; 5 — гомогенизация и криоконсервирование

ботки. После криоконсервации в течение трех недель, хранения и размораживания клеток, полученных гомогенизацией, содержание клеточной популяции CD34⁺ увеличивалось до 1,5 %. При мобилизации клеток трипсинизацией и гомогенизацией ткани в клеточной суспензии присутствовали стромальные клетки печени.

На рисунке представлены длинные по процентному содержанию клеток в образце эмбриональной печени 7-недельного срока гестации в зависимости от условий обработки ткани и хранения. Они свидетельствуют о том, что наиболее приемлемым оказался метод обработки эмбриональной печени трипсинизацией, а также о том, что по сравнению с только что обработанными клетками процентное содержание клеток с фенотипом CD34⁺ после криоконсервации и хранения возросло до 0,85 и 3,15 % соответственно. Такая же тенденция наблюдалась в других экспериментах, где исследовали образцы эмбриональной печени 5—6-недельного возраста. Так, если в образцах, подвергшихся трипсинизации, содержание CD34⁺ клеток было 5,0 и 3,89 %, то после криоконсервации оно стало соответственно 6,4 и 7,58 %. Это подтверждает наши исследования клеточного состава, которыми также показано, что клетки-предшественники лучше переносят температурную обработку по сравнению со зрелыми элементами крови.

В то же время из результатов, приведенных в таблице, видно, что при сохранении клеточных суспензий в условиях криоконсервации изменялся состав самой популяции с фенотипом CD34⁺: отмечен прирост более зрелых по мембранному фенотипу клеток, что может свидетельствовать о несовершенстве применяемой технологии криоконсервирования.

С учетом полученных данных можно сделать следующие выводы: 1) способ получения клеток методом трипсинизации представляется нам наиболее оптимальным, поскольку обеспечивает достаточно высокое содержание жизнеспособных гемопоэтических стволовых клеток; 2) проблемой при этом способе мобилизации клеток является наличие в полученных клеточных суспензиях большого количества стромальных клеток фетальной печени.

D. A. Bazika, N. V. Belyaeva, S. V. Vasilovskaya, L. L. Lukash, I. A. Votyakova, O. A. Kovalenko, G. Kh. Matsuka

Search for optimum conditions of mobilization and conservation of the fetal liver cells of human

Summary

Immunophenotyping the cells of embryonic liver in different conditions of immobilization (washing out the cells, trypsinization or homogenization of the tissue) has shown that the composition of cellular membrane antigens did not show significant difference. As in the case of a morphology study, the cellular samples were presented by the precursor cells, committed into the erythroid direction (50—70 %). The phenotype of those cells was CD34⁺/low CD117⁺ CD38⁺ HLA-DR^{low} CD90⁺ CD7^{+/low} CD45RO^{+/low} CD36⁺⁺⁺ CD71⁺⁺⁺ CD33⁺ CD13⁺ CD14^{+/low} CD61^{+/low}. Comparative analysis has shown that the portion of a «pure» CD34⁺ population was the largest in the samples of cellular suspensions where the cells were isolated by trypsinization of embryonic tissue and kept in cryoconservation conditions during 3 weeks and the smallest one in the samples of cellular suspensions, obtained by homogenization of the tissue.

Д. А. Бази́ка, Н. В. Беляева, С. В. Васильовська, Л. Л. Лукаш, І. А. Вотякова, О. О. Коваленко, Г. Х. Мацука

Пошуки оптимальних умов мобілізації і збереження клітин фетальної печінки людини

Резюме

За допомогою імунофенотипування клітин ембріональної печінки за різних умов клітинної іммобілізації (вимивання клітин, трипсинізація або гомогенізація тканини) показано, що склад мембранних антигенів суттєво не відрізняється. Як і при вивченні морфології, клітинні зразки були представлені клітинами-попередниками, комітованими в еритроїдному напрямку (50—70 %), фенотип яких: CD34⁺/low CD117⁺ CD38⁺ HLA-DR^{low} CD90⁺ CD7^{+/low} CD45RO^{+/low} CD36⁺⁺⁺ CD71⁺⁺⁺ CD33⁺ CD13⁺ CD14^{+/low} CD61^{+/low}. Порівняльний аналіз виявив, що частка «чистої» CD34⁺ популяції була найбільшою у зразках клітинних суспензій, де клітини ізолювали трипсинізацією ембріональної тканини і зберігали в умовах криоконсервації протягом трьох тижнів, а найменшою — у зразках клітинних суспензій, які отримували гомогенізацією тканини.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zandstra P. W., Le H. V., Daley G. Q., Griffith L. G., Lauffenburger D. A. Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation // Biotechnol. Bioeng.—2000.—69, N 6.—P. 607—617.
- Campagnoli C., Fisk N., Overton T. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood // Blood.—2000.—15, N 95(6).—P. 1967—1972.

3. Gratama J. W., Menendez P., Kraan J., Orfao A. Loss of CD34⁺ hematopoietic cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocyte lysing reagents // *J. Immunol. Meth.*—2000.—239.—Р. 13—23.
4. Сухих Г. Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1998.—126, прилож. 1.—С. 3—13.
5. Лукаш Л. Л., Васильовская С. В. Стволовые клетки млекопитающих *in vitro* как основа для создания современных биотехнологий // *Биополімери і клітина.*—2001.—17, № 3.—С. 203—211.
6. Черненко В. Ю., Лукаш Л. Л., Мацевич Л. Л., Кочубей Т. П., Елесичев А. А., Клименко Е. А., Горбань Л. Н. Применение метода микроэлектрофореза ДНК для оценки генотоксических эффектов мутагенов в культуре гемопоэтических клеток // *Цитология и генетика.*—2004.—38, № 1.—С. 31—35.
7. Чертков И. Л., Дризе Н. И. Как обеспечивается поддержание кроветворной системы // *Гематология и трансфузиология.*—1998.—3.—С. 3—8.
8. Базыка Д. А., Беляева Н. В., Бебешко В. Г. CD34⁺—предшественники в криоконсервированной ткани эмбриональной печени человека // *Укр. журн. гематології і трансфузіології.*—2001.—№ 3 (1).—С. 30—35.
9. Васильовская С. В., Вотякова И. А., Лукаш Л. Л., Мацука Г. Х. Получение и характеристика клеток ранних этапов гемопоэза человека с применением методов культивирования *in vitro* // *Биополімери і клітина.*—2002.—18, № 6.—С. 534—539.
10. Новые методы культуры животных тканей.—М.: Мир, 1976.—255 с.
11. MacPherson I., Montagnier L. Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus // *Virology.*—1964.—23.—Р. 291—294.
12. Сухорада Е. М., Лукаш Л. Л., Подольская С. В., Швед А. Д., Смикодуб А. И. Способ получения и культивирования эмбриональных гепатоцитов человека // *Биополімери і клітина.*—1995.—11, № 1.—С. 87—91.
13. Торубарова Н. А., Копыльцева Е. А., Студеникин В. М. Гемопоэтические клетки фетальной печени: иммунофенотипическая характеристика // *Гематология и трансфузиология.*—1998.—3.—С. 49—57.
14. Глузман Д. Ф., Авраменко И. В., Склярченко Д. М., Назорная В. А. Клеточные основы кроветворной и иммунной системы // *Лаб. диагностика онкологических заболеваний.*—Киев: МОРИОН, 1998.—С. 5—89.
15. Goltier F., Barcena A., Cruz J., Harrison M. R., Muench M. O. Mid-trimester fetal livers are a rich source of CD34^{+/++} cells for transplant. // *Bone Marrow Transplantation.*—1999.—24.—Р. 451—461.

УДК 576.5

Надійшла до редакції 31.03.03