

Strokovni prispevek/Professional article

KULTURE ČLOVEŠKIH ENDOTELNIH CELIC, IZOLIRANIH IZ ARTERIJE MAMARIJE INTERNE

HUMAN ENDOTHELIAL CELL CULTURES ISOLATED FROM INTERNAL
MAMMARY ARTERY

Tomaž Jagrič¹, Tomaž Marš², Zoran Grubič², Timotej Jagrič³, Borut Geršak⁴

¹ Glonarjeva 4, 1000 Ljubljana

² Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Ljubljana, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

³ Katedra za kvantitativne ekonomske analize, Ekonomsko-poslovna fakulteta Maribor,
Razlagova ul. 14, 2000 Maribor

⁴ Klinični oddelek za kardiovaskularno kirurgijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 2006-03-03, sprejeto 2006-09-11; ZDRAV VESTN 2006; 75: 621-8

Ključne besede *endotelne celice; celične kulture; arterija mamarija interna; tkivno inženirstvo*

Izvleček

- Izhodišča** *Cilj raziskave je pripraviti homogene kulture endotelnih celic (EC), izoliranih iz človeške arterije mamarije interne (AMI), dobljene med srčno obvodno operacijo, in jih vzdrževati v dolgoročnih kulturah. Na ta način bi skušali ugotoviti pogoje, pri katerih bi lahko v nadaljnjem delu s celičnimi kulturami prišli do zadostnega števila avtoloških arterijskih EC celic za uporabo pri populaciji, ki jo kardiovaskularne bolezni najbolj prizadenejo.*
- Metode** *V raziskavo je bilo vključenih 7 moških, starih 52-76 let, z diagnosticirano ishemično srčno boleznijo. Pri vseh je bila opravljena obvodna operacija. Iz žilnih vzorcev, ki smo jih pridobili med operacijo, smo osamili celice na dva načina: s proteolitično razgradnjo tkiva in situ ali pa s proteolitično razgradnjo iz predhodno razkosanih žilnih preparatov. Spremljali smo morfologijo in kinetiko rasti EC v 3 tedne starih kulturah. Celično specifičnost smo dokazali z imunohistokemičnim določanjem von Willebrandovega faktorja.*
- Rezultati** *Rast celic je bila prisotna le v kulturah, ki smo jih pripravili s prvo metodo. Celice so kazale tipične morfološke značilnosti EC in izražale von Willebrandov faktor. Največje število celic v kolonijah (v povprečju 11, maksimalno pa 51) so kulture dosegle v 6 dneh. Povprečen čas celic je bil 82 ± 43 ur.*
- Zaključki** *Z raziskavo smo pokazali, da je predstavljena metoda osamitve EC iz majhnega vzorca AMI primerna za pridobivanje vitalnih celic. Metoda je selektivna EC in omogoča njihovo rast v dolgoročnih kulturah. Končno število celic v kolonijah je za zdaj premajhno za uporabo v tkivnem inženirstvu, vendar bi se z optimizacijo metode v prihodnjih raziskavah lahko bolj približali temu cilju.*

Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Tomaž Jagrič, dr. med., Glonarjeva 4, 1000 Ljubljana, tel.: 040 580 846, e-mail: tomaz_jagric@email.si

Key words *endothelial cell; cell cultures; internal mammary artery; tissue ingeneering*

Abstract

- Background** *The aim of our study was to prepare homogenic and long term cultures of endothelial cells (EC) from a human internal mammary artery (IMA) obtained during a cardiac by-pass graft operation (CABG). In this way we would be able to assess the conditions suitable for the preparation of sufficient number of autologous arterial ECs and their use in a population mostly affected with cardiovascular diseases.*
- Methods** *Seven 52–76 years old male patients diagnosed with ischemic heart disease were included in our study. Samples of internal mammary artery were collected during CABG performed on these patients. EC cells were prepared from these samples using two approaches: in situ digestion with proteolytical enzymes and proteolytic digestion from the previously resected IMA vessels. Cell morphology and growth kinetics were studied in 3 weeks old cultures. EC cell specificity was determined by immunohistochemical staining for von Willebrand's factor.*
- Results** *Cell growth could be observed only in cultures prepared with the in situ proteolytic digestion. Cells showed the typical EC morphology and were positive for von Willebrand's factor. The maximal cell number in colonies (11 in average, 51 at the most) was reached after 6 days in culture. The average cell doubling time of the five cultures was 82 ± 43 hours.*
- Conclusions** *The study proved that our method of isolation is specific for ECs. Using a small IMA sample we were able to collect a number of colonies and sustain them in long term cultures, but the end numbers of cells is still too small for their application in tissue engineering (TE). Our further efforts will be focused on the optimization of the conditions which would allow sufficient proliferation of EC so that small IMA sample would be enough for the TE.*

Uvod

Kljub temu da je moderna farmakoterapija izboljšala kakovost življenja bolnikov, v številnih primerih sama vzroka bolezni ne zdravi, bodisi ker je etiologija bolezni slabo poznana, bodisi ker še ne obstajajo primerna sredstva za zdravljenje. V takih primerih je edini izhod simptomatsko zdravljenje, ki upočasni napredovanje bolezni, vendar pa v končnem obdobju bolezni organ vseeno odpove. Takrat je edina možnost zamenjava organa. Transplantacija alogeničnih tkiv in organov je zelo uspešen način zdravljenja, vendar je njena uporaba omejena. Vzroki za to so predvsem pomanjkanje darovalcev, imunska nekompatibilnost presajenih tkiv in imunosupresivno zdravljenje po presaditvi. Tkivno inženirstvo (TI) ponuja v takih primerih možno rešitev z nadomestitvijo tkivne ali organske funkcije s konstrukti, ki vsebujejo specifično populacijo celic (1).

TI je uporabno na vseh področjih medicine, med drugim tudi na področju kardiovaskularne kirurgije, kjer skušajo vzgojiti tkivo oziroma tkivni konstrukt, ki bi bil biokompatibilen in bi imel dovolj velik rastni potencial ter bi bil po odpornosti podoben nativnemu tkivu. V zadnjih letih je bil dosežen ogromen napredek na področju TI različnih delov kardiovaskularnega sistema, vključno s krvnimi žilami, srčnimi zaklopkami in srčno mišico (1–5).

V TI kardiovaskularnega sistema imajo pomembno vlogo endotelne celice (EC), ki so udeležene v številnih patoloških procesih. Obstaja več vrst EC, ki se glede na žilni izvor med seboj zelo razlikujejo. EC ve-

likih in majhnih žil se med seboj razlikujejo v ekspresiji površinskih antigenov in citoskeletnih proteinov ter po odzivu na rastne dejavnike, hormone in glede na adhezivnost krvnih komponent (6). Razlike med EC bi lahko pojasnile, zakaj se žilni grafi v svoji prehodnosti med seboj razlikujejo. Trenutno je pri srčnih obvodnih operacijah – *cardiac artery by-pass* (CABG) glavna žila izbire leva arterija mamarija interna (AMI). Uporaba te žile za obvod zagotavlja boljše preživetje in odsotnost kardialnih dogodkov, večjo obremenitveno zmogljivost bolnikov in trajnejšo prehodnost v primerjavi z uporabo vene safene (VS) (7–9). Razvoj t. i. bolezni presadka VS, z razvojem intimalne hiperplazije in ateroskleroze, pripisujejo več dejavnikom. Prurinergični receptorji P2X₄ so hitri inotropični kalcijevi kanalčki, prisotni v žilnem sistemu večine organov. Po poškodbi EC naj bi ATP, ki se iz le-teh sprošča, deloval na P2X₄ receptorje in povzročil kontrakcijo na mestu spremembe, vpleten pa bi naj bil tudi v gladkomišično hiperplazijo (10). Ray idr. so dokazali, da je na EC in neointimalnih celicah VS večje število receptorjev P2X₄ pred in po poškodbi žile, zaradi česar je večja dovzetnost za simpatično vazokonstrikcijo, aterosklerozo in intimalno hiperplazijo. Obstajajo pa tudi druge razlike med EC različnih izvorov. Ena od razlik je tudi v sintezi in izločanju dušikovega oksida (NO) v EC, ki naj bi bil odgovoren za zaščito pred trombozo in aterosklerozo. Shapira idr. so pokazali, da je sinteza vazodilatatorja NO v radialni arteriji večja kot v VS in da se arterije bolj odzivajo na NO kot

vene. Bishop-Bailey idr. so preučevali sproščanje prostaglandinov PGI_2 , ki učinkujejo vazodilatatorno, zavirajo proliferacijo gladkih mišičnih celic, akumulacijo holesterola in aktivacijo vnetnih celic ter trombocitov. Ugotovili so, da PGI_2 na arterije učinkujejo vazodilatatorno, na vene pa imajo ravno obraten učinek. Tako različen odziv je verjetno posledica različnih podtipov prostaglandinskih receptorjev EC ven in arterij. Prav tako so pokazali, da se v AMI in VS po poškodbi celic spremeni razmerje med PGE_2 in PGI_2 . Višje ravni PGE_2 , ki jih spremlja znižanje PGI_2 , povzročijo v presadkih VS nabiranje holesterola in posledično aterosklerozo (12).

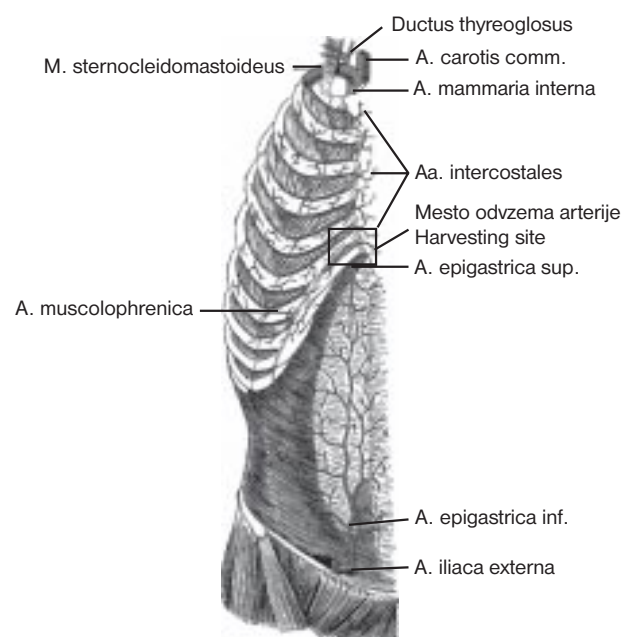
Omenjene razlike v odzivu na hormone zaradi različnih podtipov receptorjev in različne ekspresije genov za tvorbo vazodilatatorjev so vzrok različnega odziva celic in s tem tudi žilnih graftov na poškodbe, ki nastanejo med presaditvijo. Posledično je prehodnost arterijskih presadkov daljša kot prehodnost ven-skih, zato v kardiovaskularni kirurgiji poskušajo uporabljati predvsem arterijske presadke, kar pa pogosto ni mogoče. V takih primerih bi bila uporaba TI v veliko pomoč. Arterijske EC imajo v primerjavi z ven-skimi boljše lastnosti in so za področje TI in kardiovaskularne kirurgije še posebej zanimive. Cilj te raziskave je pripraviti čiste kulture EC, izoliranih iz človeške AMI, kar do sedaj še ni bilo pokazano. Ker kardiovaskularne bolezni prizadenejo predvsem starejše prebivalstvo, smo se pri naši raziskavi usmerili v pripravo kultur EC iz vzorcev AMI starejše populacije, ki smo jih dobili med operacijami CABG. Za osamitev in pripravo kultur EC se večinoma uporabljajo umbilikalne arterije, fetalne pulmonalne arterije ali avtopsijski vzorci arterije iliake. Te žile so sicer dobre za študij rasti EC, vendar nimajo večje uporabne vrednosti, saj je ciljna populacija drugačna. V raziskavah, zaradi lažje obdelave vzorcev, uporabljajo žile premera 10 cm in več, kar so veliki biopsijski vzorci, ki največkrat niso na voljo v medicinski praksi. Ker podobnih raziskav v literaturi nismo zasledili, smo z našo raziskavo poskušali pokazati, da je tudi iz majhnih vzorcev arterije, velikih 15 do 20 mm, kar smo opredelili za majhno biopsijo, mogoče pripraviti čiste kulture EC in jih uspešno dlje časa gojiti.

Metode

Kirurška izolacija in preparacija arterije mamarije interne (AMI)

V raziskavo je bilo vključenih 7 bolnikov v povprečni starosti 52–76 let. V raziskavi smo uporabili končne dele AMI, ki se po doktrini odstranijo in zavržejo ob preparaciji in pripravi AMI za CABG. Za to ni bilo potrebno izvesti nikakršnega dodatnega posega in pridobitev privoljenja bolnikov ni bila potrebna. Vsi bolniki, katerih vzorce AMI smo uporabili v raziskavi, so bili moškega spola in so imeli diagnosticirano ishemično srčno bolezen. Pri vseh je bila opravljena operacija CABG. Indikacija za uporabo AMI je bila okluzija proksimalne leve sprednje descendente arterije.

Vzorec AMI smo dobili iz končnega dela AMI pri bifurkaciji na epigastrično in muskulofrenično arterijo med operacijo CABG, kot je opisano v literaturi (13). Shematski prikaz anatomije in postopkov priprave AMI je na Sliki 1.



Sl. 1. Anatomsko shema AMI, njenih vej, razcepišč in mesto odvzema žilnega vzorca.

Figure 1. The anatomy of internal mammary artery, its branches and the harvesting site.

Pred uporabo AMI za operacijo CABG smo od izolirane žile odrezali približno 15 mm dolg kos arterije, ki smo ga prenesli v hranilni pufer (0,14 M NaCl, 0,04 M KCl, 0,011 M D-glukoza v 0,001 M PBS v 1 l H_2O , 100 enot/ml penicilina, 0,1 mg/ml streptomocina) (6). Do nadaljnje obdelave (v 48 urah) smo vzorce hranili pri 4 °C. Preparacija vzorcev žil je potekala v Laboratoriju za celične kulture na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Preparacija je potekala v sterilnih pogojih pod stereo lupo. Med preparacijo smo vzorce hranili v mediju 199 (Sigma, ZDA). Iz vzorcev žil smo odstranili vezivo in mišično tkivo. Navadno smo iz enega vzorca pridobili do dva prehodna odseka AMI. Dele žil, ki makroskopsko niso kazali večjih znakov poškodb, smo uporabili za osamitev EC, preostale smo zavrgli.

Osamitev in kultiviranje človeških arterijskih endotelijskih celic (EC)

Za osamitev EC iz dobljenih kosov AMI smo uporabili dva postopka. Prvi je bil razgradnja tkiva *in situ* s proteolitičnim encimom kolagenazo, pri drugem postopku pa smo žile razrezali na majhne koščke, jih nato razgradili s kolagenazo, dobljeno suspenzijo pa nato centrifugirali pri 1000 obratih na minuto pet minut in tako celice ločili od medija s kolagenazo.

Pri prvem načinu smo v en konec žile vstavili 1,2 mm debelo iglo za brizgo. Okoli žile z vstavljenim iglo smo zavezali kirurški šiv (Ethilon 4/0 ali svila), nakar smo zavezali še drugi konec žile. Tako pripravljeno žilo smo prenesli v medij 199 in predinkubirali 30–45 minut pri 37 °C. Svetlino žile smo napolnili z raztopino 0,2 g/l kolagenaze, pripravljene v mediju 199 (37 °C). Inkubacija s kolagenazo je potekala 15 minut pri 37 °C. Po opravljeni inkubaciji smo steno žile perforirali in prebrizgali s hranilnim medijem 199, ki je vseboval 20-odstotni toplotno inaktivirani humani serum, 1 mM L-glutamata, 100 enot/ml penicilina in 0,1 mg/ml streptomocina in tako izprali sproščene EC iz žile v gojitveno posodo. Naslednji dan smo v medij dodali še 0,1 mg/ml EC ravnega dejavnika (ECGF) (R&D Systems, Velika Britanija) in 70 E/ml heparina. Pri drugem načinu smo žilne koščke, ki so bili premajhni za kanuliranje, razrezali po dolžini in jih razprli. Razprte žile smo razrezali na 1 mm velike tkivne koščke in jih dali v medij 199 z 0,2 g/l kolagenazo. V mešalniku smo koščke tkiva inkubirali 20–30 minut pri 37 °C s počasnim mešanjem, nakar smo suspenzijo celic centrifugirali 5 minut pri 1000 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo supernat aspirirali in zavrgli, usedlino s celicami pa resuspendirali v hranilnem mediju 199 kot pri prvem postopku. Dobljeno suspenzijo smo prenesli v gojitvene posode.

EC smo gojili v gojitvenih posodah s premerom 60 mm, ki smo jih prej tretirali s kolagenom IV (Collaborative Biomedical Productions-Beckton Dickenson, ZDA). Gojenje celic je potekalo v inkubatorju pri 37 °C in 5-odstotni CO₂ atmosferi. Medij smo menjavali na 2–3 dni.

Spremljanje celične rasti

Z invertnim svetlobnim mikroskopom (Zeiss, Nemčija) smo dnevno spremljali morfologijo in kinetiko rasti. Pri majhnem začetnem številu celic se vsaka kolonija razvije iz ene celice. Takšno gostoto celic imenujemo klonalna gostota. Ker smo celice gojili na klonalni gostoti, smo lahko ocenili, koliko celic smo dobili iz posameznega vzorca žile. Bili smo pozorni, kdaj so celice v koloniji dosegle največje število in koliko jih je bilo. Celične kulture smo skušali vzdrževati v kulturah čim dlje časa in vsaj 16–25 dni. Pri tem so nas zanimale morebitne spremembe v celični morfologiji po daljšem gojenju.

Določanje podvojitvenega časa celic

Za določitev podvojitvenega časa smo pod invertnim mikroskopom v kulturah določali število celic. Ko so celice v kolonijah dosegle maksimalno število, smo celice v posameznih kolonijah prešteli in zabeležili čas, ki je bil potreben, da so se celice prenehale deliti. Izračunali smo konstanto celične rasti po enačbi $N_t = N_0 e^{kt}$ (6, 14), podvojitveni čas pa po enačbi $t_2 = (\ln 2)/k$, pri čemer je N_t število celic ob času t , N_0 število celic ob času 0, k konstanta celične rasti in t_2 podvojitveni čas celic. Iz podvojitvenih časov posameznih kolonij v eni kulturi smo izračunali povprečni podvojitveni čas celic v tej kulturi. Vse rezultate smo izrazili kot aritmetično sredino \pm SD.

Določanje prisotnosti von Willebrandovega faktorja (faktor) VIII

V EC smo z imunocitokemičnim barvanjem dokazovali prisotnost von Willebrandovega faktorja, kar je najbolj priznana metoda identificiranja EC (15). Uporabili smo primarna protitelesa proti človeškemu von Willebrandovemu faktorju. Iz posod, v katerih smo gojili EC, smo odstranili medij, nato smo celice dvakrat sprali s fosfatnim pufrom. Sledila je 15-minutna fiksacija celic s 4-odstotnim formalinom, pripravljenim iz paraformaldehida (Sigma, ZDA) v fosfatnem pufru. Po fiksaciji smo celice spirali s fosfatnim pufrom, nakar je sledila 30-minutna inkubacija v raztopini primarnih protiteles, razredčenih v razmerju 1 : 500. Sledilo je spiranje in 30-minutna inkubacija v raztopini sekundarnih protiteles (Jackson Immunoresearch, ZDA), razredčenih v razmerju 1 : 200 in označenih s fluorescein izotiocianatom (FITC). Po inkubaciji s sekundarnimi protitelesi in spiranju smo barvali jedra 5 minut v 0,1-odstotni raztopini barvila Hoechst 33258 (MolecularProbes, ZDA), nakar smo celice vklopili v 70-odstotni glicerol. Tako pripravljene preparate smo opazovali in fotografirali na mikroskopu IX80 (Olympus, Japonska) z ustreznimi filtri za UV svetlobo.

Rezultati

Kirurška izolacija in prepariranje AMI

Vzorci posameznih darovalcev so bile žile z dolžinami 15–20 mm. V nekaterih vzorcih so bili končni deli leve in desne AMI. Po prepariranju žil pod lupo smo se odločali, ali je vzorec žile primeren za nadaljnjo obdelavo. Za nadaljnjo obdelavo niso bile primerne žile, ki so se poškodovale pri preparaciji ali med kanuliranjem svetline, in tiste, ki so bile poškodovane med samo operacijo zaradi klipanja ali elektrokoagulacije. Od 7 darovalcev nam je uspelo dobiti 5 uporabnih žil, ki so bile primerne za celično osamitev in pripravo kultur, celična rast pa je uspela pri treh žilah.

Spremljanje celične rasti

V celičnih kulturah, ki smo jih pripravili z drugim načinom obdelave tkiva, torej s predhodnim razrezanjem žilnih koščkov, rasti celic ni bilo opaziti. Pod invertnim mikroskopom smo opazili le celični drobir. Po enem tednu smo takšne kulture zavrgli.

V gojitvenih posodah, kjer so bile celice pridobljene s prvim načinom obdelave, torej s proteolitično razgradnjo tkiva *in situ*, smo opazili posamezne celice, iz katerih so se kasneje razvile kolonije. V nobeni kulturi ni bilo vidnega preraščanja fibroblastov ali gladkih mišičnih celic, ki se po morfologiji razlikujejo od EC. Pod svetlobnim mikroskopom so posamezne celice imele tipična jajčasta jedra z 2–3 jedrci in jajčasto celično obliko. Po nekaj delitvah so celice postale bolj elongirane in so v večjih kolonijah kazale za EC tipično, tlakovcem podobno morfologijo. Kulture EC niso dosegle konfluence. Celice so dosegle maksimalno število v 6 dneh (\pm 1). Takrat je bilo v kulturah vidnih več kolonij, ki so vsebovale 2–51 celic. Kolonije

so bile razpršene po celotni površini gojitvene posode. Po pritrditvi na podlago ni bilo opaziti večjih migracij celic. Vzdrževanje dolgoročnih kultur je bilo enostavno, saj ni bilo opaziti odmiranja celic. V starejših kulturah smo opazili tudi nekoliko večje celice z razoblikovanim jedrom in posamezne večje celice z več jedri. Takšne morfološke spremembe so bile prisotne le v kolonijah z večjim številom celic. Medij smo menjavali na 2–3 dni. Na ta način so celice preživele več tednov. Povprečni opazovalni čas za kolonije je bil 16–25 dni. Čeprav so celice uspešno preživele daljše obdobje v kulturah, se za multiple pasaže nismo odločili. Ker so bila končna števila celic v kolonijah premajhna, bi pri ponovni tripsinizaciji izgubili preveč celic, da bi lahko nastale nove kolonije. Slika 1 prikazuje 6 dni staro kolonijo celic pod fazno-kontrastnim mikroskopom.

Podvojitveni čas kolonije

Podvojitvene čase celic smo izračunali v petih kulturah. Povprečni podvojitveni čas celic vseh kultur je bil 82 ur (± 43). V Razpredelnici 1 so zbrana povprečna števila celic v koloniji, povprečni podvojitveni časi posameznih kolonij v kulturah in povprečni podvojitveni čas za vse kulture.

Razpr. 1. Podvojitveni časi.
Table 1. Cell doubling times.

Št. kulture Cul. No.	Št. celic Cell No.	t_{max} (dnevi) t_{max} (days)	k	$t_{opazovanja}$ (dnevi) t_{obs} (days)	t_{povp} (ure) t_{avg} (ure)
1	3,17 \pm 1,33	7	0,0064 \pm 0,002	16	124 \pm 48
2	2,8 \pm 1,09	7	0,0058 \pm 0,002	16	134 \pm 46
3	5,75 \pm 5,56	5	0,0121 \pm 0,007	25	72 \pm 37
4	17,3 \pm 14,6	5	0,021 \pm 0,01	25	38 \pm 19
5	25,5 \pm 31,8	5	0,0217 \pm 0,016	25	43 \pm 31

Št. kulture – številka kulture, Št. celic – število celic v koloniji \pm SD, t_{max} – čas, v katerem celice v koloniji dosežejo največje število v dnevih, k – konstanta celične rasti \pm SD, $t_{opazovanja}$ – čas opazovanja celic v dnevih, t_{povp} – povprečni podvojitveni čas v kulturi v urah \pm SD

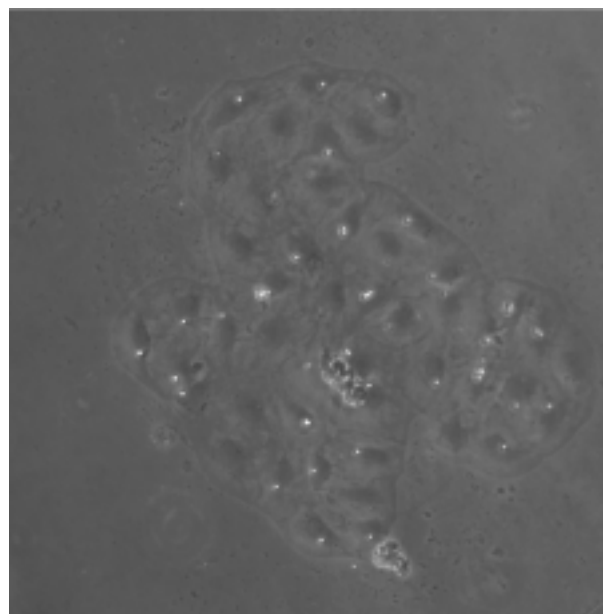
Cul. No. – number of the culture, Cell No. – number of cell in a colony, t_{max} – the time necessary to reach maximal cell density in days \pm SD, k – the constant of cell growth \pm SD, t_{obs} – observation time in days, t_{avg} – the average cell doubling time in the culture in hours \pm SD

Dokazovanje von Willebrandovega faktorja

Z imunocitokemičnim barvanjem smo pokazali, da 3 tedne stare kulture celic, pripravljene iz AMI, izražajo von Willebrandov faktor. Ugotovili smo, da se protein v celicah nahaja perinuklearno in na robovih celic, verjetno vezan na membrano. V določenih celicah je bilo izražanje proteina močnejše. Slika 3 prikazuje imunohistokemično dokazan von Willebrandov faktor.

Razpravljanje

Ena izmed ovir pri uporabi TI pri človeku je dobiti primerni vir celic za kulturo in prenos na nosilni material. Ta problem je izrazitejši pri uporabi EC, ki bi sicer imele na področju TI veliko uporabnost, a so težko dostopne. V najnovjših raziskavah se vse bolj poslužujejo uporabe matičnih celic, ki se pri dolo-



Sl. 2. Kolonija celic pod fazno-kontrastnim mikroskopom.

Figure 2. Typical colony of EC under phase contrast microscope.

čenih pogojih diferencirajo v zelene celice. Sicer bi lahko na ta način dobili EC, vendar pa pri naši metodi ni bilo potrebno uporabljati specifičnih načinov osamitve in gojenja celic, ki so potrebni pri matičnih celicah. V večini študij so uporabili predvsem celice, pridobljene iz umbilikalne arterije in vene, fetalne celice, pa tudi celice, pridobljene iz avtopsijskih vzorcev. Te celice sicer zelo dobro rastejo in so odličen model za študij celične rasti in funkcije, vendar so neuporabne pri populaciji bolnikov, ki bi s TI dobljena tkiva najbolj potrebovali. Z našo raziskavo smo pokazali, da lahko iz 15 mm velikega vzorca AMI, dobljenega med operacijo CABG, osamimo čiste kulture EC in jih sorazmerno enostavno vzdržujemo v 3 tedne starih kulturah.

Med kardiovaskularnimi boleznimi so na prvih treh mestih v zahodnem svetu arterijska hipertenzija, ateroskleroza in stenoza aortne zaklopke. Med kardiovaskularnimi operacijami je zamenjava aortne zaklopke na drugem mestu (16). Izdelava avtolognih aortnih zaklopk s TI je dobra alternativa v primerjavi z današnjimi umetnimi in biološkimi zaklopkami. Ker je v zahodnem svetu vzrok za aortno stenozo kalcifična aortna stenoza, ki se pojavlja pri 64 letih za bikuspidalno in pri 73 letih za trikuspidalno stenozo (17), smo tudi v našo raziskavo vključili darovalce te starosti. Darovalci žil so bili moški, stari 52–76 let, pri katerih je bila načrtovana operacija CABG. Pri vseh je bila indikacija za uporabo AMI pri CABG proksimalna okluzija leve descendente arterije. Za izolacijo žile med operacijo CABG in za to skupino bolnikov smo se odločili iz dveh razlogov. Po eni strani je sama operacija CABG najprimernejša za izolacijo AMI, saj med operacijo neuporabne konce AMI na mestu bifurkacije sicer zavržemo, mi pa smo le-te lahko uporabili

za tkivne kulture. Druga prednost izbire teh bolnikov pa je dejstvo, da spadajo ti darovalci v ciljno populacijo bolnikov, primerno za dajanje TI.

Šele med preparacijo žil pod lupo smo lahko ocenili, ali bo žila primerna za uporabo. Čeprav je bil tkivni vzorec (vezivo, mišice in žila) sorazmerno majhen in dostikrat poškodovan že med operacijo, smo s preparacijo dobili razmeroma veliko število uporabnih žil. Pri nekaterih vzorcih nam je uspelo izolirati dva distalna dela žile, kar bi lahko v prihodnjih raziskavah pomagalo pri študiju primerjave rasti celic enega darovalca pod različnimi pogoji, kot na primer študij gojenja celic v različnih medijih.

V nobeni od gojitvenih posod, v katerih so bile celice, dobljene z razrezom žilnih koščkov, ni bilo opazne rasti celic. Glavni razlog za to je bil verjetno izbor žil za ta postopek. Za centrifugiranje smo namreč uporabili žile, ki so bile premajhne za kanuliranje, in tiste, ki so se poškodovale med operacijo. Preparati so verjetno vsebovali premalo vitalnih celic, iz katerih bi se lahko razvile kolonije EC. Druga možna razlaga pa je sam način obdelave. Metoda, ko smo tkivne vzorce razrezali in te nato obdelali s kolagenazo, je bila že sama po sebi veliko bolj agresivna kot metoda *in situ* digestije tkiva. Celice so bile med kirurško izolacijo podvržene mehanskim poškodbam, med centrifugiranjem, pipetiranjem in proteolitično razgradnjo pa so se še dodatno poškodovale, zaradi česar so odmrle.

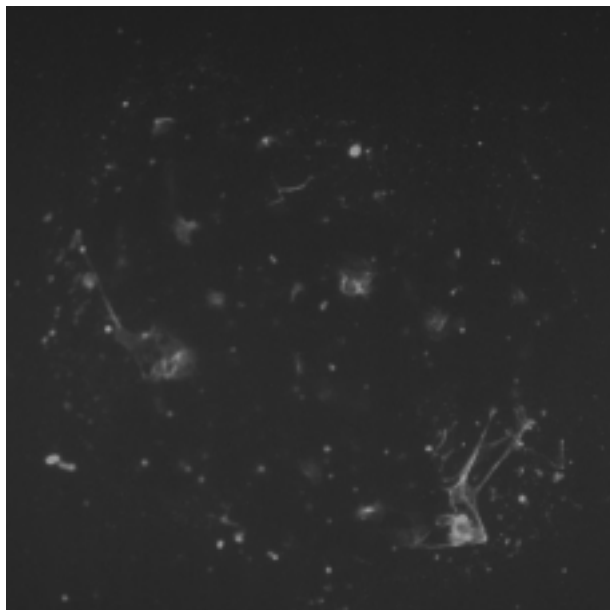
Drugачe je bilo s celicami, ki smo jih dobili s kanuliranjem in proteolitično razgradnjo tkiva *in situ*. V gojitvenih posodah smo po 2–3 dneh opazili posamezne celice, ki so se nato začele deliti. Tudi v drugih študijah, kjer so z osamitvijo dobili majhno število EC, so ugotovili, da so se celice šele 3–4 dni po osamitvi pritrdile na podlago (18). Po morfoloških merilih se posamezne celice niso razlikovale od EC, opisanih v literaturi (6, 18–21), tudi izgled celic v kolonijah je bil morfološko enak kot pri drugih raziskavah. Z našo metodo smo uspeli ohraniti in vzdrževati rast celic v majhnem številu, kar je najbrž posledica majhnega vzorca, ki nam je bil na razpolago (kos žile je meril 15–20 mm). Maciag idr. (19) so pokazali, da je rast celic pri klonalnih gostotah (125 do 1,25 celic/cm²) uspešnejša na fibronektinu kot matriksu, ob prisotnosti fetalnega govejega seruma in ECGF s heparinom, zato smo jih uporabili tudi pri naših kulturah, le da smo namesto fibronektina uporabili kolagen IV, ki se je v drugih študijah (6) izkazal kot enakovreden in cenejši matriks za pritrditev celic na podlago.

Celice so se prenehale deliti po 6 dneh. Rezultati se ujemajo s podobnimi raziskavami drugih avtorjev (6, 18–21). Kolonije so takrat vsebovale 2–51 celic (povprečno 11), vendar je bilo moč opaziti veliko variabilnost števila celic med posameznimi kolonijami, celo med kolonijami v isti kulturi. Takšne razlike med celicami kažejo na različen rastni potencial posameznih celic. Kljub podobnim rastnim pogojem pa je bilo v kolonijah manjše število celic kot pri drugih študijah. Verjetno je k temu botrovalo manjše izhodiščno število celic v kulturah. Ker so bili darovalci žil starejše osebe, smo tudi zaradi tega pričakovali manjši rastni potencial celic. V kulturah se proliferacija celic zaustavi

po različnem številu delitev. Hayflickov model celične staranja (senescence) (22, 23) trdi, da se s starostjo darovalca vse bolj omejuje življenjska doba celic, krajšajo se telomere, kopičijo se s starostjo povezane na β -galaktozidazo (SA β -gal⁺) pozitivne celice, pride do motnje celičnih funkcij. Sorazmerno s starostjo darovalca se povečuje hitrost nastopa staranja celic in manjša rastni potencial, kar pa ne pomeni, da celice, ki se v kulturi prenehajo deliti, izgubijo rastni potencial. Druga možna razlaga je, da se celicam v starejših kulturah nakopiči dovolj genskih in epigenetskih sprememb, ki lahko vodijo do tega, da se celice ne odzivajo na mitotične signale (22). Prav tako pa se lahko v celicah pod določenimi pogoji aktivira telomerazna aktivnost, ki prepreči krajšanje telomer (24). Telomeraza se lahko aktivira ne le v zarodnih celicah in celicah imunskega sistema, temveč tudi v EC, ki med regeneracijo aktivirajo telomerazo (23). Vse to kaže, da bi lahko bil rastni potencial EC v naših kulturah večji, kot smo ga ugotovili do zdaj in da je pod določenimi pogoji, kot na primer s spremembo medija, dodajanjem drugih rastnih faktorjev ali celo spremembo tehnike obdelave žil, možno spodbuditi delitve ter tako dobiti primerno število celic za uporabo pri TI.

Zaradi manjšega začetnega števila EC so bili potrebni 3 dnevi, da so se celice pritrdile na podlago. Ker takoj po osamitvi celice še niso bile vidne z mikroskopom, nismo mogli oceniti deleža celic, ki se je dejansko pritrdil na podlago. Ko se je to zgodilo, smo opazili, da dobro uspevajo tudi po daljšem gojenju, ne da bi se končno število celic zmanjšalo. V 3 tedne starih kulturah lahko nastopijo morfološke spremembe celic, ki so posledica neprimernih ali neoptimalnih pogojev v kulturi (6).

Celične delitve so potekale po sigmoidni krivulji, ki je značilna za rast celic v kulturah. Slika 4 prikazuje rast števila celic v odvisnosti od časa. Sprva je število celic eksponentno naraščalo, nato pa se je delež deležih se celic postopno manjšal, zato je število EC počasi doseglo plato. V eksponentni fazi rasti so se celice delile po kinetiki prvega reda, na podlagi česar smo lahko izračunali podvojitveni čas kolonij, ki je znašal povprečno 82 ur (\pm 42). Velika standardna deviacija kaže, da so bile med kolonijami velike razlike v podvojitvenih časih. Verjetno so kolonije vsebovale celice z različnim rastnim potencialom. Če primerjamo podvojitvene čase EC iz makrovaskularnih žil pri podobnih raziskavah, vidimo, da so drugje med 29 in 35 ur in torej bistveno nižji. Razliko bi lahko deloma razložil tudi različen izvor celic. Knedler idr. so pokazali, da EC iz omentuma v kulturi rastejo hitreje kot druge mikrovaskularne EC, ker s seboj prinašajo angiogeni faktor (21). Upoštevati je treba tudi starost darovalcev. Celice starejših darovalcev se počasneje in manjkrat delijo. To lahko ugotovimo, če primerjamo rast celic, ki so jih dobili Glassberg idr. iz avtopsijskih vzorcev arterije iliake starejših darovalcev. Podvojitveni čas kulture so ocenili na 48 ur, kar je bližje našim rezultatom. Pomembna pa je heterogenost celic v rastnem potencialu med različnimi kolonijami, tudi v isti kulturi. Podvojitveni časi so se gibali med 21 in 168 ur. Z našo raziskavo ne moremo oceniti, ali so razlike nastale zaradi poškodbe celic, različnih deležev t. i.



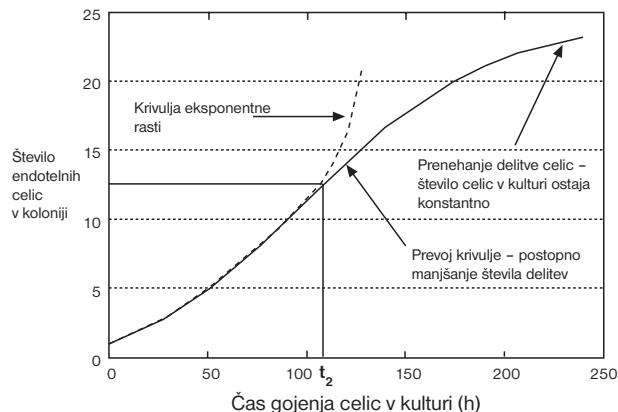
Sl. 3. Imunohistokemično določanje von Willebrandovega faktorja.

Figure 3. Immunohistochemical staining of von Willebrand's factor.

tihih celic ali razlik med pripravo kulture. Vsekakor je težko primerjati podvojitvene čase celic različnih izvorov in različnih študij, ker rastejo v različnih medijih in tako ne moremo izključiti vpliva medija na rast. Poudariti pa je treba, da je podvojitveni čas kolonije nezanesljiv parameter za oceno celične kinetike (14) in bi z natančnejšimi metodami, kot na primer s t. i. *time-laps* videomikroskopijo, pretočno citometrijo, avtoradiografskim določanjem števila mitoz, verjetno dobili drugačne vrednosti.

Imunohistokemično smo pokazali izražanje von Willebrandovega faktorja v 3 tedne starih celicah. Takšen rezultat potrjuje, da je uporabljena metoda gojenja celic selektivna za EC in omogoča diferenciacijo celic. Tudi po daljšem gojenju so celice ohranile specifične receptorje za vWF, čeprav je bilo opaziti manjše razlike v moči izražanja proteina med posameznimi celicami.

Z raziskavo smo pokazali, da je predstavljena metoda osamitve EC primerna in selektivna za pridobivanje vitalnih EC ter omogoča njihovo rast po daljšem gojenju. S predstavljenimi metodami smo sicer uspešno osamili EC iz AMI, dobljene med operacijo CABG, vendar je bilo končno število celic v kolonijah premajhno, da bi celice lahko uporabili za nadaljnje raziskave na področju TI. Vseeno pa smo dokazali, da je mogoče dobiti razmeroma veliko število kolonij EC tudi iz tako majhnega vzorca, kot je 15–20 mm velik kos AMI. Dobljene kolonije smo brez večjih težav vzdrževali 3 tedne, ne da bi se število celic pri tem bistveno zmanjšalo, kar je pogoj za *in vitro* raziskave na EC. Trenutno torej uporaba tako pridobljenih celic za področje TI še ni mogoča. V prihodnjih raziskavah bo zato treba poiskati pogoje, ki bodo omogočili pridobitev večjega števila celic iz majhnega vzorca AMI odrasle-



Sl. 4. Grafični prikaz rasti števila celic, izračunana s programom MATLAB; t_2 : podvojitveni čas.

Figure 4. Cell growth in graphical form as calculated with the programme MATLAB; t_2 : cell doubling time.

ga človeka. Bolniki, ki potrebujejo tkiva za operacijsko zamenjavo, so predvsem iz starejše populacije, pri takih pa uporaba fetalnih celic ni mogoča, saj so omejeno dostopne in antigensko nekompatibilne, uporaba matičnih celic za diferenciacijo v EC pa je sicer odličen nadomestek uporabe diferenciranih celic. Zahteva pa posebne postopke za osamitev in kultiviranje celic, ki so precej dražje in tehnično niso izvedljive v vseh laboratorijih.

Literatura

- Nugent HM, Edelman ER. Tissue Engineering Therapy for cardiovascular disease. *Circ Res* 2003; 92: 1068–78.
- Neuenschwander S, Hoerstrup SP. Heart valve tissue engineering. *Transplant Immunology* 2004; 12: 359–65.
- Griffith LG. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann NY Acad Sci* 2002; 961: 83–95.
- Tranquillo RT. The tissue-engineered small-diameter artery. *Ann NY Acad Sci* 2002; 961: 251–4.
- Musey PL, Ibim SM, Talukder NK. Development of artificial blood vessels. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961: 279–83.
- Beekhuizen H, van Furth R. Growth characteristics of cultured human macrovascular venous and arterial and microvascular endothelial cells. *J Vasc Res* 1994; 31: 230–9.
- Ray FR, Huang W, Slater M, Barden JA. Prurinergetic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts. *Atherosclerosis* 2002; 162: 55–61.
- Tashiro T, Nakamura K, Iwakuma A, Zaitu R, Iwahashi H, Murai A, et al. Inverted T graft: novel technique using composite radial and internal thoracic arteries. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 629–31.
- Norihomme PH, Underwood MJ, El Khoury GA, Glineur D, Elias B, d'Udekem, Dion RA. Recycling of arterial grafts during reoperative coronary artery operations. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 641–4.
- Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez JM, Hollmann M, Karschin C, Stuhmer W. P2X4: an ATP-activated inotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3684–8.
- Shapira OM, Xu A, Aldea GS, Vita JA, Shemin RJ, Keaney, Jr JF. Enhanced nitric oxide-mediated vascular relaxation in radial artery compared with internal mammary artery or saphenous vein. *Miocardial Protection and Vascular Biology* 1999; 100: 322–7.
- Bishop-Bailey D, Pepper JR, E-B, Haddad E-B, Newton R, Larkin SW, Jane A, et al. Induction of cyclooxygenase-2 in human saphenous vein and internal mammary artery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 17: 1644–8.

13. Peterson MD, Borger MA, Rao V, Peniston CM, Feindel CM. Skeletonization of bilateral internal thoracic artery grafts lowers the risk of sternal infection in patients with diabetes. *Y Thor Card Surg* 2003; 126: 1314-9.
14. Van Furth R, Elzenga-Claasen I, van Schadewijk-Nieuwstad M, Diesselhof-den Dulk MMC, Tiovonon H, Rytömaa T. Cell kinetic analysis of a murine macrophage cell line. *Eur J Cell Biology* 1987; 44: 93-6.
15. Jaffe EA. Culture and identification of large vessel endothelial cells. In: Jaffe EA, ed. *Biology of endothelial cells*. Dordrecht: Martinus Nyhof; 1987. p. 1-13.
16. Stephan PJ, Henry III AC, Hebel Jr RF, Whiddon L, Roberts WC. Comparison of age, gender, number of aortic valve cusps, concomitant coronary artery bypass grafting, and magnitude of left ventricular-systemic arterial peak systolic gradient in adults having aortic valve replacement for isolated aortic valve stenosis. *Am J Cardiol* 1997; 79: 166-72.
17. Davies MJ, Treasure T, Parker DJ. Demographic characteristics of patients undergoing aortic valve replacement for aortic stenosis: relation to valve morphology. *Heart* 1996; 75(2): 174-8.
18. Glassberg MK, Bern MM, Coughlin SR, Haudenschild CC, Hoyer LW, Antoniades HN, Zetter BR. Cultured endothelial cells derived from the human iliac arteries. *In Vitro* 1982; 18(10): 859-66.
19. Maciag T, Hoover GA, Stemerman MB, Weinstein R. Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 1981; 91: 420-6.
20. Gorfien S, Spector A, DeLuca D, Wiess S. Growth and physiological functions of vascular endothelial cells in a new serum-free medium (SFM). *Experimental Cell Research* 1993; 206: 291-301.
21. Knedler A, Ham RG. Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 1987; 23: 481-91.
22. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; 33: 919-26.
23. Yegorov YE, Zelenin A. Duration of senescent cell survival in vitro as a characteristic of organism longevity, an additional to the proliferative potential of fibroblasts. *FEBS* 2003; 541: 6-10.
24. Koloquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA, Gerald WL. Expression of TERT in early premalignant lesions and subset of cells in normal tissue. *Nature Genetics*; 19: 182-6.