

КУЧМА М.Д.^{1,2}, КИРИК В.М.³, СВІТІНА Г.М.¹, ШАБЛІЙ Ю.М.¹, ЛУКАШ Л.Л.²,
ЛОБИНЦЕВА Г.С.¹, ШАБЛІЙ В.А.^{1,2}

¹ Інститут клітинної терапії,

Україна, 03680, м. Київ, пр-т Комарова, 3, e-mail:kuchma@gmx.com

² Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

³ ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН»,

Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67

СХОЖІСТЬ ТА ВІДМІННІСТЬ ПОПУЛЯЦІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ/ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ІЗ РІЗНИХ ТКАНИН ЛЮДИНИ

Дослідження останніх років показали, що плацента людини відіграє важливу роль у фетальному гемопоезі [1, 2], і вважається, вона може бути потенціальним додатковим джерелом гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин (ГСПК) для трансплантацій при онкогематологічних захворюваннях і вроджених порушеннях кровотворення [1]. Однак імунофенотип плацентарних ГСПК і їх здатність до мультипотентного диференціювання все ще недостатньо вивчені. Для оцінки можливості застосування ГСПК із зрілої плаценти для клінічних цілей необхідно дослідити їх особливості порівняно з ГСПК іншого походження. Саме порівняльна характеристика клітин із різних джерел може дозволити краще прогнозувати їх функціональну активність і ефективність при практичному застосуванні. Для такого дослідження нами було обрано пуповинну кров, оскільки вона широко використовується для трансплантацій та фетальну печінку, яка є активним органом плодового гемопоезу, що містить найвищу концентрацію CD34+ клітин у порівнянні із фетальним кістковим мозком, пуповинною кров'ю, дорослим кістковим мозком та «мобілізованою» периферичною кров'ю [3]. Отже, безперечно актуальними завданнями є встановлення подібностей та відмінностей популяції плацентарних ГСПК у порівнянні із ГСПК пуповинної крові та фетальної печінки.

Матеріали і методи

Виділення фракції мононуклеарних клітин із тканини зрілої плаценти та пуповинної крові. Дослідження, що проводились із тканиною людини, були схвалені біоетичним комітетом Інституту клітинної терапії (№ 3–13). Плаценту (n = 16) отримували після пологів (фізіологічних або шляхом кесаревого розтину) на 39–

41 тижні вагітності у 23–36-річних жінок з їх інформованої згоди. Пуповинну кров збирали за стандартною методикою (n = 15). У крові донорів визначали наявність антитіл та антигенів інфекційних агентів. Зразки тканини плаценти тестували на наявність аеробних, анаеробних бактерій, а також грибової інфекції. Для дослідження тканину подрібнювали на фрагменти 1-3Ч1-3Ч1-3 мм, які промивали розчином Хенкса до повного знебарвлення розчину. Тканину ферментували двома методами: за методом № 1 тканину обробляли розчином ферментів: 0,2 % колагенази I (Serva, Німеччина), 0,35 мг/мл гіалуронідази (Sigma, США), 100 од/мл DNase I (Sigma, США) у фосфатно-сольовому розчині (PBS, Roch, Germany) з додаванням 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA) протягом 30–50 хв при +37 °С. Тканину, що залишилась, інкубували зі свіжою порцією ферментів протягом 20–40 хв при +37 °С. Фракцію клітин, що була отримана в обох варіантах ферментування об'єднували. За методом № 2 відміту тканину ферментували за допомогою 0,1 % колагенази та 0,6 од/мл діспази I (Gibco, Germany) у ростовому середовищі DMEM (Sigma, USA) з додаванням 5 мМ HEPES (Biomedicals, France) протягом 20–30 хв при +37 °С. Фракцію мононуклеарних клітин отримували шляхом фракціонування на фіколі (щільність 1,077 г/мл, Biochrome, Німеччина). При розділенні пуповинної крові на фіколі розводили зразки крові розчином PBS у співвідношенні 1:4. Фракцію мононуклеарних клітин з пуповинної крові обробляли такою ж сумішшю ферментів, як і тканину плаценти за методом № 1 протягом 50 хв при 37 °С і відмивали від залишків ферментів в PBS з додаванням 1 мг/мл BSA.

Отримання суспензії клітин фетальної печінки плодів людини першого триместру гестації. Джерелом для отримання фетальної печін-

ки ($n = 7$) були абортівні ембріони людини 7–12 тижнів гестації, отримані в результаті добровільного переривання вагітності з інформованої згоди жінок. Використання фетальної тканини для досліджень було схвалено біоетичним комітетом Інституту клітинної терапії (№ 3–13). Суспензію клітин фетальної печінки отримували шляхом гомогенізації в гомогенізаторі Поттера в розчині Хенкса з наступним фільтруванням через клітинний фільтр з діаметром пор 100 мкм.

Визначення потенціалу до диференціювання. Клітини плаценти та пуповинної крові культивували в кількості $5 \cdot 10^4$ на чашку Петрі (Ш35 мм) у середовищі MethoCult (StemCell Technologies, Канада). Підрахунок колоній здійснювали на 14 добу росту.

Проточна цитометрія. Для імунофенотипування клітин використовували такі мічені флуорохромом моноклональні антитіла фірми BectonDickinson, США: anti-CD34 APC, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD14 PacificBlue, anti-45RA FITC, anti-CD7 PE, anti-CD19 PE-Cy7, anti-CD33 FITC, anti-CD235a PE. Аналізували лише популяцію живих клітин, які не забарвлювались барвником 7-AAD. Імунофенотипування проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (BectonDickinson, США) за допомогою програми FACSDiva 6.1.2, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 6 параметрів флуоресценції.

FISH аналіз. FISH аналіз проводили на клітинах колоній, що утворювались і підрозувались до 14-тої доби. Для аналізу брали плаценту від новонароджених чоловічої статі. Аналіз проводили із використанням проб CEPX SpectrumOrange та CEPYSpectrumGreen (AbbotMolecular, USA) згідно інструкції виробника. Для візуалізації ядер використовували DAPI (AbbotMolecular, USA). Для аналізу підраховували 300 ядер. Візуалізацію проводили на флуоресцентному прямому мікроскопі ZeissAxioImager.M1 (CarlZeiss, USA).

Статистична обробка результатів. Результати представлені у вигляді середніх величин з 95 % довірчим інтервалом. Статистичну значимість відмінностей між вибірками визначали за допомогою U-критерію Манна–Уїтні.

Результати та обговорення

У даній роботі нами охарактеризовано імунофенотип ГСПК плацентарної тканини у порівнянні із ГСПК пуповинної крові та фетальної печінки, і при цьому виявлено певні подібності та відмінності. Крім того, показано схожість потен-

ціалу до диференціювання *in vitro* клітин плацентарної тканини та пуповинної крові.

Як описано вище, виділення фракції моонуклеарних клітин із зрілої тканини плаценти проводили двома методами. Метод № 1 був модифікацією методу, що застосовувався в роботі [1], де використовували суміш ферментів колагенази, ДНКаз та гіалуронідази. Модифікація полягала в зменшенні концентрації гіалуронідази в два рази, що було достатньо для руйнування гіалуронової кислоти, яка робить розчин в'язким та заважає виділенню клітин на етапі фільтрування та центрифугування. Такий метод дозволяв ферментувати фрагменти тканини повністю та в подальшому отримувати ГСПК для аналізу на проточному цитофлуориметрі. Метод № 2 застосовувався раніше в роботі [4] і дозволяв отримувати фракцію клітин з нативної та кріоконсервованої плацентарної тканини, які утворювали клони мезенхімальних стромальних клітин за умов культивування на адгезивному пластику *in vitro*. Виділення ГСПК методом № 2 дозволяло наблизити протокол їх отримання до методів, які надалі можуть мати практичне значення, що передбачає використання лише декількох ферментів у низьких концентраціях при нетривалому часі інкубації з ними. Кількість клітин популяції ГСПК серед життєздатних $CD45^+$ клітин достовірно не відрізнялась при виділенні клітин обома методами, що дозволяє використовувати їх відповідно до поставлених завдань (кількісні дані будуть приведені далі).

Для визначення ГСПК у популяціях, виділених із плацентарної тканини, пуповинної крові і фетальної печінки було обрано протокол ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering). Аналіз показав, що вміст ГСПК ($CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$) серед життєздатних $CD45^+$ клітин нативної плацентарної тканини, виділених за методом №1 та №2, достовірно не відрізнявся та складав 0,56 % (0,39–0,76 %, $n = 16$) та 1,14 % (0,29–2,55 %, $n = 5$) відповідно. Вміст клітин з фенотипом $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$ серед популяції $CD34^+CD45^{low}$ клітин, виділених із плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки складав 79,7 % (73,4–85,3 %, $n = 16$), 94,7 % (90,9–97,6 %, $n = 15$) та 78,9 % (58,6–93,6 %, $n = 6$) відповідно. Отже, кількість ГСПК серед $CD34^+CD45^{low}$ клітин в плацентарній тканині та фетальній печінці була практично однаковою ($p < 0,05$), але достовірно нижча у порівнянні з пуповинною кров'ю ($p < 0,05$). Результати проведених досліджень показали, що для правильної

оцінки кількості ГСПК, особливо для плацентарної тканини та тканини фетальної печінки, методом проточної цитофлуориметрії необхідно проводити гейтування за морфологією, так як вміст SSC^{low} клітин серед CD34⁺CD45^{low} клітин складає лише біля 80 %.

У даній роботі проаналізовано експресію лінійних маркерів, таких як CD33, CD14, CD235, CD19, CD7, CD45RA у всіх популяціях ГСПК із зрілої тканини плаценти та пуповинної крові.

У пуповинній крові, плацентарній тканині та фетальній печінці були присутні ГСПК, що не експресували аналізовані лінійні маркери. Так, у фетальній печінці (n = 4), пуповинній крові (n = 5) та зрілій плацентарній тканині (n = 5) були присутні 36,2 % (21,4–52,5 %), 90,3 % (78,3–97,8 %) та 47,8 % (29,1–66,9 %) клітин із фенотипом CD34⁺CD45^{low}SSC^{low}CD33⁻CD14⁻CD235⁻ відповідно. Вміст лінійно-комітованих клітин серед ГСПК плаценти був достовірно вищий, ніж у пуповинній крові, та нижчий у порівнянні з фетальною печінкою. До того ж сумарний вміст лімфоїдних прогеніторів серед ГСПК був достовірно вищий в фетальній печінці (n = 7), ніж у пуповинній крові (n = 6) та плацентарній тканині (n = 6), а саме 50,9 % (39,6–62,0 %), 3,9 % (1,8–6,3 %) та 6,9 % (0,9–18,1 %) відповідно. Популяція ГСПК плаценти (n = 6) містила вищу кількість мієлоїдних та еритроїдних прогеніторів, ніж відповідна популяція пуповинної крові (n = 6) та меншу кількість, ніж популяція фетальної печінки (n = 6). Так, вміст мієлоїдних та еритроїдних прогеніторів серед ГСПК для фетальної печінки (n = 6), пуповинної крові (n = 6) та плацентарної тканини (n = 6) становив 52,5 % (30,2–74,3 %), 7,9 % (1,5–18,6 %) та 19,8 % (8,9–33,8 %) відповідно. Співвідношення різних лінійно-комітованих ГСПК серед усіх комітованих ГСПК у пуповинній крові та плаценті достовірно не відрізнявся.

При культивуванні *in vitro* мононуклеарної фракції клітин із зрілої плаценти на 14 добу утворювались колонії всіх типів: CFU-B, CFU-E, CFU-M, CFU-GM, CFU-GMEM. При цьому слід відзначити, що при культивуванні мононуклеарної фракції плаценти спостерігалась наявність тих самих типів колоній, що виявляються при культивуванні ядровмісної фракції клітин пуповинної крові. Тож, ГСПК з плаценти та пуповинної крові характеризуються подібною здатністю до направленої диференціювання. У літературі вже є свідчення, що при культивуванні ГСПК із зрілої плаценти утворюються різні типи колоній

[1, 5]. Порівняння відносного рівня вмісту різних типів колоній, що утворюються при культивуванні клітин плаценти та пуповинної крові, показало, що ГСПК обох тканин мають схожий потенціал до мультилінійного диференціювання *in vitro*, незважаючи на більший вміст комітованих гемопоетичних попередників в плацентарній тканині. Однак, як показано вище, відносний вміст ГСПК, комітованих в мієлоїдному та еритроїдному напрямках серед усіх комітованих гемопоетичних прогеніторів не відрізнявся. FISH аналіз показав, що ГСПК, які одержували з плацент новонароджених чоловічої статі і вирощували в культурі, мали X та Y хромосоми. Таким чином, плацентарні ГСПК мають плодове походження. Раніше повідомлялось, що CD34⁺ та CD34⁻ клітини плаценти 9 тижня гестації утворюють CFU-Mix колонії з клітин фетального походження [5].

Можна зробити висновок, що присутність лінійно-комітованих клітин у тканині плаценти свідчить про проходження активного гемопоезу у тканині. Як відомо, активне кровотворення у фетальній печінці відбувається головним чином на 7–15 тижні гестації, в цей період вміст гемопоетичних клітин від усіх клітинних елементів органу становить близько 60 % [6]. Таким чином, порівняно високий вміст лінійно-комітованих ГСПК у тканині зрілої плаценти свідчить про проходження плацентарного гемопоезу. Таким чином, сукупність даних наших експериментальних досліджень імунофенотипу ГСПК та їхнього колонієутворювального потенціалу та літературних даних [1, 2, 5] свідчить на користь уявлення, що плацента виконує роль активного гемопоетичного органу протягом всього терміну вагітності. Однак питання, чи генеруються ГСПК *de novo* у плацентарній тканині, чи мігрують із інших органів кровотворення і заселяють плацентарну тканину, де проліферують та диференціюються, залишається відкритим.

На основі отриманих експериментальних даних нами підраховано, що в середньому із однієї плаценти можна отримати $2,2 \cdot 10^6$ ($1,6 \cdot 10^6$ – $3,0 \cdot 10^6$) ГСПК за умови, якщо середня нормальна вага плаценти становить 540 г, кількість мононуклеарних клітин на 100 г тканини – $1 \cdot 10^8$, а кількість CD45⁺ клітин становить 74 % серед усіх мононуклеарних клітин, ізольованих із плацентарної тканини. Тож, одна плацента містить кількість ГСПК, що характерно для зразка пуповинної крові. Так, показано, що середня загальна кількість клітин із фенотипом CD34⁺CD45⁺ в пуповинній крові (n = 300) становить $3,1 \cdot 10^6$

[7]. В інших роботах показано, що кількість $CD34^+CD45^+$ клітин варіює в межах $0,5-2,6 \times 10^6$ для зразка пуповинної крові [8]. У роботі Варсена А. та співавторів показано, що загальна кількість $CD34^{+/+}CD45^{low}$ клітин у зрілій плаценті у 100 разів вище, ніж у хоріоні першого триместру та у 10 разів вище, ніж у такій тканині другого триместру. Це пов'язано із ростом плаценти під час розвитку. За даними цих авторів кількість $CD34^{+/+}CD45^{low}$ клітин становить $1,0-12,2 \times 10^6$ для одного зразка зрілої плаценти [1].

Ми припускаємо, що використання зрілої плаценти як додаткового джерела кровотворних клітин, разом із пуповинною кров'ю для трансплантацій дозволить усунути недоліки трансплантації пуповинної крові, пов'язані із малим вмістом та незрілістю їхніх прогеніторних клітин. Так, нами показано, що плацентарні ГСПК *in situ* є більш комітовані в мієлоїдному, еритроїдному напрямках, ніж ГСПК пуповинної крові. Є свідчення, що кількість комітованих клітин, а саме ранніх мієлоїдних ГСПК, є найбільш точним показником загального обсягу колонієутворювальних клітин в аллотрансплантатах. Їхній високий вміст в продуктах лейкофезу, після мобілізації G-CSF, у порівнянні із трансплантами кісткового мозку і пуповинної крові, забезпечують більш швидке приживлення клітин після трансплантації [9]. Трансплантат пуповинної крові містить у 26–65 разів меншу кількість всіх мієлоїдно-комітованих $CD34^+$ клітин, ніж трансплантати кісткового мозку та «мобілізованої» периферичної крові від дорослих донорів. Слід відзначити, що у той час, як мієлоїдно-комітовані ГСПК сприяють ранньому відновленню ней-

трофілів і тромбоцитів, це дає певну можливість для примітивних ГСПК дозріти та вступити в гемопоез [10]. Є такі дані, що у фетальній печінці колонієутворювальні клітини із високим проліферативним потенціалом представляють собою ранні мієлоїдні попередники, і автори вважають, що стовбурові клітини містяться у фракції $CD33^+$ клітин [11]. У популяції $CD34^+$ клітин кісткового мозку спостерігається значно вищий вміст пізніх еритроїдних, пізніх мієлоїдних та В-лімфоїдних прогеніторів, ніж у пуповинній крові та продуктах лейкофезу. Тим не менш, саме вміст $CD34^+CD38^-$ клітин є важливим параметром для прогнозування вдалого відновлення тканин пацієнта після трансплантації [10]. Також, варто звернути увагу, що може бути важливим використання для трансплантації ГСПК, які локалізовані безпосередньо у власній ніші, а саме в плацентарній тканині, а не лише ГСПК пуповинної крові, які циркулюють.

Висновки

Встановлено, що ГСПК зрілої тканини плаценти містять достовірно вищу кількість лінійнокомітованих клітин у порівнянні з відповідною популяцією клітин ГСПК пуповинної крові, однак нижчу, ніж у популяції ГСПК фетальної печінки. Показано, що фетальні ГСПК із зрілої плацентарної тканини та пуповинної крові мають схожий потенціал до мультилінійного диференціювання *in vitro*. Отримані нами дані свідчать на користь уявлення про проходження процесу гемопоезу у тканині плаценти. Отже, плацента може стати цінним джерелом ГСПК для медицини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Břrcena A., Kapidzic M., Muench M.O., Gormley M., Scott M.A., Weier J.F., Ferlatte C., Fisher S.J. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development // *Developmental Biology*. – 2009. – 327, N 1. – P. 24–33.
2. Serikov V., Hounshell C., Larkin S., Green W., Ikeda H., Walters M.C., Kuypers F.A. Human Term Placenta as a Source of Hematopoietic Cells // *Exp Biol Med*. – 2009. – 234, N 7. – P. 813–823.
3. Huang S., Law P., Young D., Ho A.D. Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood vs. adult bone marrow and mobilized peripheral blood // *Exp Hematol*. – 1998. – 26, N 12. – P. 1162–1171.
4. Шаблій В.А. Характеристика мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, виділених із нативної та кріоконсервованої тканини плаценти людини : автореферат дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук. : спец. 03.00.20 «Біотехнологія». – К., 2013. – 24 с.
5. Robin C., Bollerot K., Mendes S. Human Placenta Is a Potent Hematopoietic Niche Containing Hematopoietic Stem and Progenitor Cells throughout Development // *Cell Stem Cell*. – 2009. – 5, N 4. – P. 385–395.
6. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Шерешков С.И. Гемопоетические клетки эмбриональной печени. – К.: Наукова Думка, 1988. – С. 1–192.
7. Selves P., Perales A., Moraga R., Saucedo E., Soler M.A., Monleon J. Maternal, neonatal and collection factors influencing the haematopoietic content of cord blood units // *Acta Haematol*. – 2005. – 113, N 4 – P. 241–246.
8. Wu J.Y., Liao C., Xu Z.P., Chen J.S., Gu S.L., Huang Y.N., Li Y., Tang X.W., Yang X., Tang P.H., Tsang K.S. Banking and transplantation of umbilical cord blood in Guangzhou, China // *Cytotherapy*. – 2006. – 8, N 5 – P. 488–497.

9. Bensinger W.I., Martin P.J., Storer B, Clift R., Forman S.J., Negrin R., Kashyap A., Flowers M.E., Lilleby K, Chauncey T.R., Storb R, Appelbaum F.R. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers // *N Engl J Med.* – 2001. – 344, N 3 – P. 175–181.
10. Theilgaard-Munch K., Raaschou-Jensen K., Schjmidt K., Heilmann C., Vindeløv L., Jacobsen N., Dickmeiss E. Pluripotential myeloid-committed CD34⁺ subsets in hematopoietic stem cell allografts // *Bone Marrow Transplant.* – 2003. – 32, N 12. – P. 1125–1133.
11. Muench M.O., Cupp J., Polakoff J., Roncarolo M.G. Expression of CD33, CD38, and HLA-DR on CD34⁺ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential // *Blood.* – 1994. – 83. – P. 3170–3181.

KUCHMA M.D.^{1,2}, **KYRYK V.M.**³, **SVITINA G.M.**¹, **SHABLIY YU.M.**¹, **LUKASH L.L.**², **LOBYNTSEVA G.S.**¹, **SHABLIY V.A.**^{1,2}

¹ *Institute of Cell Therapy,*

Ukraine, 03680, Kyiv, Komarova ave., 3, e-mail:kuchma@gmx.com

² *Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,*

Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150

³ *State Institute of Genetics and Regenerative Medicine, National Academy of Medical Sciences of Ukraine,*

Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshgorodska str., 67

SIMILARITIES AND DIFFERENCES OF HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS POPULATION FROM DIFFERENT HUMAN TISSUES

Aims. We have determined the similarities and the differences of HSPCs populations from the full-term placental tissue (FTPT) compared to HSPCs from the cord blood (CB) and the fetal liver (FL). **Methods.** HSPCs from FTPT have been obtained by enzymatic method. The immunophenotyping have been performed on BD FACSAria (USA). MethoCult (Canada) has been used for differentiation assays. **Results.** The content of HSPCs (CD34⁺CD45^{low}SSC^{low}) among CD34⁺CD45^{low} population from FTPT and FL was the same but significantly lower comparing to CB. FTPT contains significantly higher number of lineage committed HSPCs in compare to CB but lower than to FL. HSPCs from FTPT and CB have similar potential to multilineage differentiation *in vitro*. **Conclusions.** Observed similarities and differences of HSPCs from studied tissues and other data evidence about the process of placental hematopoiesis and permit to suggest that FTPT is a valued source of HSCs for medicine.

Keywords: hematopoietic stem/progenitors cells, placenta, cord blood, fetal liver.