

ГЕМОПОЕТИЧНІ ПРОГЕНІТОРНІ КЛІТИНИ ПЛАЦЕНТИ ТА ПУПОВИННОЇ КРОВІ: ІМУНОФЕНОТИПОВИЙ АНАЛІЗ ТА ПОТЕНЦІАЛ ДО ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ *in vitro*

М. Д. Кучма^{1,2}

В. А. Шаблій^{1,2}

В. М. Кирик³

Г. М. Світліна²

Ю. М. Шаблій²

Ю. К. Прокопець²

Т. М. Індиченко²

Л. Л. Лукаш¹

Г. С. Лобинцева²

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Київ

²Інститут клітинної терапії, Київ, Україна

³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини
НАМНУ», Київ, Україна

E-mail: k.maria@ua.fm

Отримано 29.05.2014

Метою роботи було порівняльне дослідження характеру диференціювання гемопоетичних прогеніторних клітин плаценти та пуповинної крові *in vivo* та їхніх мультипотентних властивостей *in vitro*. Застосовували методи виділення фракції мононуклеарних клітин із пуповинної крові, тканини зрілої плаценти і фетального хоріона, проточної цитометрії та аналізу потенціалу до диференціації. Виявлено, що більшість гемопоетичних прогеніторних клітин як у зрілій плаценті, так і в пуповинній крові залишаються незрілими елементами, але при цьому плацентарна тканина відрізняється вищим вмістом лінійно-комітованих клітин, серед яких: мієлоїдні попередники з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD33^+SSC^{low}$, більш зрілі мієлоїдні прогенітори з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$ (вміст достовірно вищий, ніж у пуповинній крові), еритроїдні прогенітори з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD235^+SSC^{low}$ (вміст достовірно вищий, ніж у пуповинній крові), В-лімфоїдні прогенітори з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD19^+SSC^{low}$, Т-лімфоїдні прогенітори та Natural Killer Cells-прогенітори з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD7^+SSC^{low}$, а також зрілі Т-лімфоцити на різних стадіях дозрівання з фенотипами $CD7^+CD45^+$ та $CD7^+CD45RA^+CD45^+$ відповідно. В умовах *in vitro* гемопоетичні прогеніторні клітини плацентарної тканини мають подібний до клітин пуповинної крові мультипотентний потенціал. Найявність у плацентарній тканині кровотворних клітин на різних стадіях та напрямках диференціювання свідчить про те, що в плаценті відбувається гемопоез упродовж усього терміну гестації.

Ключові слова: плацентарний гемопоез, гемопоетичні прогеніторні клітини.

Значною проблемою гематології залишається дефіцит донорів гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) для трансплантації за онкогематологічних захворювань і вроджених порушень кровотворення. У 1988 р. було вперше застосовано трансплантацію ГПК пуповинної крові, яку на сьогодні широко застосовують у лікуванні пацієнтів з онкогематологічними та іншими захворюваннями.

ГПК пуповинної крові мають свої переваги та недоліки порівняно з клітинами інших джерел — кісткового мозку та мобілізованої периферичної крові, що їх використовують під час трансплантацій. Переваги: легкість і безпека одержання клітин; ефективне зберігання типованих за HLA (human leukocyte

antigen) клітин у кріоконсервованому стані в банках пуповинної крові, які доступні для негайного використання, а також зразків, сумісних лише за 3 чи 4 генами HLA; досить низька вірогідність розвитку гострої та хронічної реакції «трансплантат проти хазяїна». Проте існують і недоліки порівняно з ГПК кісткового мозку, зокрема більш тривалий час відновлення нормального рівня нейтрофілів, тромбоцитів та лімфоцитів; менша вірогідність приживлення трансплантата, недостатня кількість зібраних клітин [1]. Тому актуальним залишається подальший пошук нових додаткових джерел ГПК.

Було встановлено, що плацента людини відіграє важливу роль в ембріональному ге-

мопоезі [2, 3]. Однак імунофенотип плацентарних ГПК і їхню мультипотентність ще недостатньо вивчено. Дослідження плацентарних ГПК і порівняння їхніх властивостей з клітинами інших джерел необхідні для оцінки можливостей їх клінічного застосування. Отже, метою роботи було дослідження особливостей імунофенотипу кровотворних клітин плаценти та їхнього потенціалу до диференціації порівняно з ГПК пуповинної крові *in vitro*.

Матеріали і методи

Виділення фракції мононуклеарних клітин із пуповинної крові, тканини зрілої плаценти та фетального хоріона. Плаценту одержували після пологів (фізіологічних або шляхом кесаревого розтину) на 39–41-му тижні вагітності у 23–36-річних жінок за їхньої інформованої згоди. Пуповинну кров збирали за стандартною методикою. Джерелом фетальної плаценти були абортівні ембріони людини 7–8 тижнів гестації в результаті добровільного переривання вагітності за інформованої згоди жінок. Пуповинну кров і плаценту брали від донорів, у крові яких не містилось антитіл до HIV-1/2, HCV, coHbV, HBsAg, *Treponema pallidum*, а тканина плаценти була негативна на ДНК *Chlamidium trachomatis*, *Mycoplasma genitalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* та HSV-1/2. Для виділення клітин плаценту очищали від амніотичної оболонки і відрізали пуповину. Плацентарну тканину подрібнювали стерильними ножицями на фрагменти 1–3 мм, які промивали розчином Хенкса для видалення залишків крові до повного знебарвлення розчину для промивання. Потім тканину обробляли розчином ензимів: 0,2% колагенази I (Serva, Німеччина), 0,35 мг/мл гіалуронідази (Sigma, США), 100 од/мл DNase I (Sigma, США) з додаванням 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA) протягом 30–50 хв при +37 °С. Далі плацентарні клітини збирали шляхом фільтрування через клітинний фільтр з діаметром пор 70 мкм (Becton Dickinson, США). Після оброблення ензимами їх відмивали у фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS) з додаванням 1 мг/мл BSA. Тканину, що залишилась, інкубували зі свіжою порцією ензимів упродовж 30–60 хв за +37 °С. Клітини також відмивали і об'єднували. Із фетального хоріона клітини виділяли тим самим методом, що й зі зрілої плаценти, однак час оброблення ензимами скорочували до 15–30 хв. Фракцію мононуклеарних клі-

тин зі зрілої та фетальної плаценти і пуповинної крові виділяли фракціонуванням на фіколі (щільність 1,077 г/мл, Biochrome, Німеччина), двічі відмивали, фільтрували через клітинний фільтр з діаметром пор 40 мкм. Фракцію мононуклеарних клітин із пуповинної крові обробляли такою самою сумішшю ензимів, як і тканину плаценти, протягом 50 хв за 37 °С і відмивали від залишків ензимів у PBS, додаючи 1 мг/мл BSA.

Проточна цитометрія. Для імунофенотипування плацентарних клітин та клітин пуповинної крові використовували такі флуорохром-мічені моноклональні антитіла (Becton Dickinson, США): anti-CD34 APC, anti-CD90 FITC, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD105 PerCP-Cy 5.5, anti-CD73 PE, anti-CD14 Pacific Blue, anti-CD31 PE, anti-CD133 PE, anti-45RA FITC, anti-CD7 PE, anti-CD19 PE-Cy7, anti-CD33 FITC, anti-CD235a PE. Аналізували лише популяцію живих клітин, які не забарвлювалися 7-AAD. Імунофенотипування проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програми FACSDiva 6.1.2, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 6 — флуоресценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів під час багатопараметричного аналізу використовували контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним з антитіл окремо (single stained control) та зразки з комбінацією декількох антитіл без одного (fluorescence minus one control).

Аналіз потенціалу до диференціації. Виділені й очищені за наведеною вище методикою клітини культивували в середовищі MethoCult (Stem Cell Technologies, Канада) при +37 °С в атмосфері з 5% CO₂ в дублях. Колонії підраховували на живих препаратах на 14-ту добу культивування.

Статистичний аналіз. Результати подано у вигляді середніх величин з 95%-м довірчим інтервалом. Статистичну значущість відмінностей визначали за допомогою U-критерію Манна-Уїтні.

Результати та обговорення

У роботі проаналізовано експресію лінійних маркерів, зокрема CD33, CD14, CD235, CD19, CD7, CD45RA у всіх популяціях ГПК із загальним фенотипом CD34⁺CD45^{low}SSC^{low} зі зрілої і фетальної плацентарної тканини та пуповинної крові.

69,4% (45,3–88,9%) у популяції ГПК зрілої плаценти та 87,6% (76,8–95,3%)

у популяції ГПК пуповинної крові не експресували жодних з аналізованих лінійних маркерів ($CD34^+CD45^{low}Lin^-SSC^{low}$). Такий фенотип свідчить про те, що більшість ГПК як у плаценті, так і в пуповинній крові залишаються незрілими елементами, однак при цьому вміст лінійно-комітованих клітин у плацентарній тканині достовірно вищий, ніж у пуповинній крові (рис. 1).

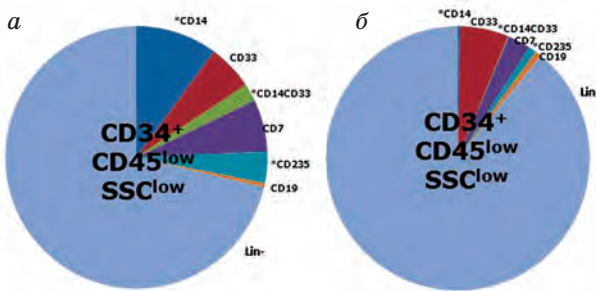


Рис. 1. Присутність недиференційованих ($CD34^+CD45^{low}Lin^-SSC^{low}$), міелоїдних ($CD34^+CD45^{low}CD33^+SSC^{low}$, $CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$, $CD34^+CD45^{low}CD33^+CD14^+SSC^{low}$), Т-лімфоїдних ($CD34^+CD45^{low}CD7^+SSC^{low}$), еритроїдних ($CD34^+CD45^{low}CD235^+SSC^{low}$) та В-лімфоїдних ($CD34^+CD45^{low}CD19^+SSC^{low}$) прогеніторних клітин: у плацентарній тканині (а) та пуповинній крові (б) (тут і далі: $*P < 0,05, n = 6$)

Зріла плацентарна тканина, як і пуповинна кров, містить популяцію ранніх міелоїдних попередників із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD33^+SSC^{low}$ у кількості 5,5% (1,8–11,0%) та 5,9% (0,4–17,3%) відповідно серед усіх ГПК ($CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$) (рис. 2). Як відомо, CD33 — один з маркерів, що характерний для клітин ранньої стадії диференціювання в міелоїдному напрямі [4, 5], а клітини, що експресують одночасно $CD34^+CD33^+$, належать до міелоїдних прогеніторів [6]. В умовах культури $CD34^+CD13^+CD33^+$ клітини кісткового мозку утворюють колонії переважно міелоїдного походження [7].

Нами встановлено, що більшість з усіх комітованих у різні напрями прогеніторів у популяції пуповинної крові припадає на $CD34^+CD45^{low}CD33^+SSC^{low}$ -клітини, що було продемонстровано і в роботах інших авторів [8, 9]. Ми досліджували наявність $CD34^+CD45^{low}CD33^+SSC^{low}$ -клітин у фетальній плаценті 8-го тижня гестації та спостерігали 1,7% таких клітин серед усіх ГПК (рис. 3). Vargas та ін. також виявляли субпопуляції $CD34^{++}CD45^{low}$ - і $CD34^+CD45^{low}$ -клітин, що експресували CD13, CD 33 і CD44, але на 12-му тижні гестації. При цьому більшість

CD34-клітин експресували CD13, а 5–30% CD34-клітин — CD33, але найбільш незрілі популяції $CD34^{++}CD45^{low}$ -клітин мали низький рівень експресії цього антигену [2].

У зрілій плацентарній тканині виявлено також субпопуляцію більш зрілих міелоїдних попередників із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$ у кількості 9,8% (1,3–25,0%, $n = 6$) серед усіх ГПК, однак така субпопуляція містилась у пуповинній крові в незначній кількості (рис. 2). CD14 вважають міелоїдним маркером, він з'являється на моноцитах пізніших стадій дозрівання, а експресується на базофілах та нейтрофілах [10, 11]. CD14 експресується також на початкових і проміжних етапах диференціювання дендритних клітин [12]. $CD34^+CD14^+CD1a^-$ -клітини пуповинної крові можуть диференціюватись у моноцитарні або в дендритні клітини залежно від дії

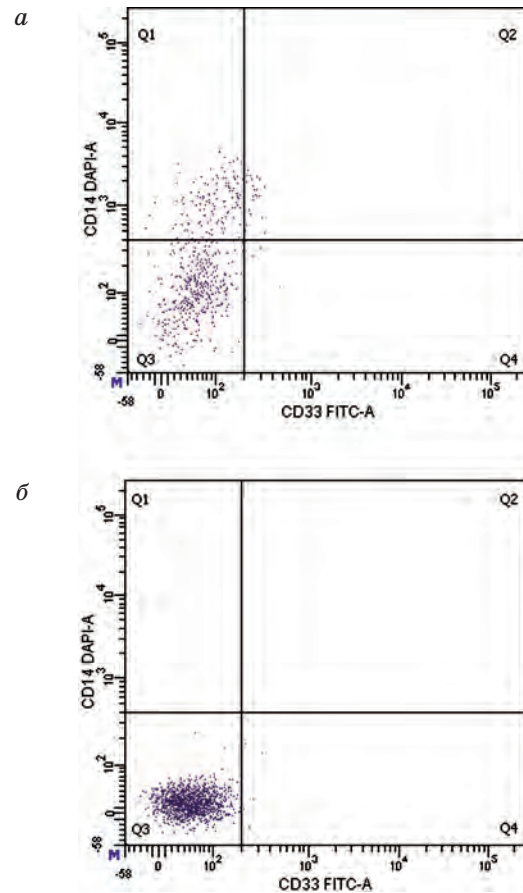


Рис. 2. Двовимірні гістограми експресії поверхневих маркерів CD33 та CD14 на клітинах із фенотипом $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$ тканини:

плаценти (а) та пуповинної крові (б). На осях відкладено інтенсивність флуоресценції у відповідних каналах (програма BD FACSDiva 6.1.2)

різних ростових факторів [13]. Є дані, що $CD14^+$ мієлоїдноподібні клітини пуповинної крові можуть бути прогеніторами NK (Natural Killer Cells)-клітин. Так, клітини із фенотиповими характеристиками мієлоїдних клітин, зокрема з коекспресією $CD14$, $CD11b$, $CD11c$, $CD13$ і $CD33$, можуть диференціюватись у NK-клітини за культивування з такими факторами росту, як *flt3*-ліганд чи SCF- та інтерлейкін-15 [14]. Таку субпопуляцію $CD34^+$ -клітин, яка коекспресує $CD14$ у пуповинній крові, раніше могли й не знаходити [8], однак з'ясовано, що $CD34^+$ -клітини пуповинної крові можуть експресувати пізні маркери: $CD14$ та $CD15$ [15], але їхня частка зовсім незначна [9]. У кістковому мозку $CD34^+$ -клітини не експресують такі маркери зрілих клітин, як $CD3$, $CD11b$, $CD14$, $CD20$ [16]. Ми показали, що 7,2% ГПК у фетальній плаценті 8-го тижня гестації мають фенотип $CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$ (рис. 3). Загалом, як було з'ясовано раніше, популяція ГПК плаценти досить гетерогенна і містить клітини з фенотипами $CD34^{+++}CD45^{low}$, $CD34^{++}CD45^{low}$ та $CD34^{+/low}CD45^{low}$. При цьому зі зменшенням рівня $CD34$ збільшується експресія маркера $CD14$, а також $CD19$ та $CD7$. Слід зазначити, що субпопуляція $CD34^{++}CD45^{low}$, яка є найбільш незрілою, оскільки експресує $CD133$ і є негативною за $CD33$, $CD235$, $CD19$, $CD7$ та $CD45RA$, характеризувалась експресією $CD14$ на рівні 3% (0,5–7,6%, $n = 4$) [17]. Подібну залежність було також встановлено Вареца та ін., які з'ясували, що зростання експресії $CD14$ на $CD13^+CD33^+$ -клітинах корелювала зі втратою $CD34$ у тканині хоріона 12-го тижня гестації. Це свідчило про наявність субпопуляції зрілих мієлоїдних $CD14^+$ -клітин, які є спеціалізованими резидентними макрофагами, присутні, починаючи з 4-го тижня гестації до утворення зрілої плаценти, і становлять першу зрілу й найпоширенішу популяцію лейкоцитів у плаценті [2]. У нашій роботі показано, що в зрілій плацентарній тканині деяка частина $CD14^+$ -клітин має фенотип прогеніторних клітин, а отже, це — пізні мієлоїдні прогенітори. До того ж не всі $CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$ -клітини експресують $CD33$, оскільки популяцію з фенотипом $CD34^{low}45^{low}CD14^+CD33^+SSC^{low}$ виявлено лише в кількості 2,1% (0,9–3,5%), на відміну від пуповинної крові, де ми знаходили таку популяцію лише в деяких зразках у незначній кількості. Вважаємо, що $CD34^{low}45^{low}CD14^+CD33^+SSC^{low}$ -клітини, ймовірно, є субпопуляцією прогеніторних клітин проміжної стадії комітування.

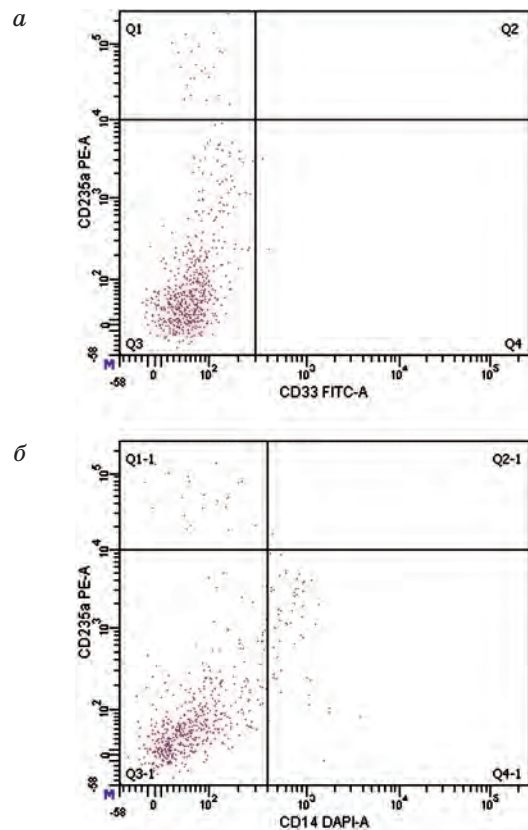


Рис. 3. Двовимірні гістограми експресії поверхневих маркерів $CD33$, $CD14$ та $CD235$ на клітинах із фенотипом $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$ фетальної плаценти 8-го тижня гестації

Отже, більшість із комітованих прогеніторів, як у пуповинній крові, так і в плаценті, є мієлоїдними, однак у плаценті вони більш диференційовані, ніж у пуповинній крові. Інші автори, що вивчали плаценту людини на першому триместрі, виявляли макрофагальні прогенітори в плаценті навіть до моменту, коли наставала фетоплацентарна циркуляція: вони утворювались *de novo* в плаценті або мігрували туди як прогенітори крізь позазародкову мезодерму [18]. Ми показали, що такі прогенітори залишаються і в зрілій плаценті. Загалом, у плаценті вміст та гетерогенність мієлоїдних клітин вищі, ніж у пуповинній крові. Відмінністю та особливістю плацентарних ГПК, як у зрілій, так й у фетальній плаценті, є наявність значної кількості пізніх мієлоїдних прогеніторів із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$.

Зріла плацентарна тканина містить достовірно більшу кількість еритроїдних прогеніторів із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD235^+SSC^{low}$, ніж пуповинна кров, вміст їх серед усіх ГПК становив 3,8% (0,5–9,7%, $n = 6$, $P < 0,05$) та 0,2% (0,1–0,3%, $n = 6$, $P < 0,05$) відповідно (рис. 4). Як відомо, $CD235$

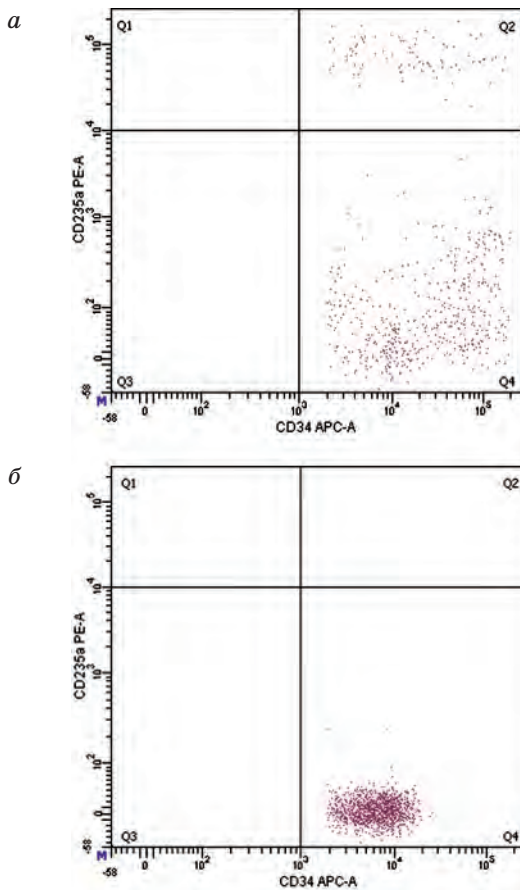


Рис. 4. Двовимірні гістограми експресії поверхневого маркера CD235 на клітинах із фенотипом CD34⁺CD45^{low}SSC^{low} тканини: плаценти (а) та пуповинної крові (б)

(Glycophorin A) експресується на зрілих еритроцитах [19] та примітивних ембріональних еритроїдних клітинах, серед яких є клітини з фенотипом Glycophorin A⁺CD41⁺, що можуть коекспресувати CD34 і містять еритроїдні та мегакаріоцитарні прогенітори, а також клітини-попередники, що дають змішані колонії [20].

Встановлено, що деяка частина ГПК пуповинної крові, кісткового мозку та мобілізованої периферичної крові коекспресує CD34 і CD235, при цьому рівень їх експресії не відрізняється [21]. Хоча не у всіх роботах виявляли коекспресію CD34 та CD235 на клітинах пуповинної крові [8], однак у незначній кількості продемонстровано коекспресію маркерів CD34 та CD36 (останній експресується на еритроїдних прогеніторах) [8, 22]. З'ясовано, що в пуповинній крові присутні клітини з фенотипом CD34⁺CD71⁺, які є ранніми еритроїдними прогеніторами [23], але в меншій кількості, ніж мієлоїдні [8]. У фетальній плаценті 8-го тижня гестації вміст еритроїдних попередників (CD34⁺CD45^{low}CD235⁺SSC^{low})

у популяції ГПК становив 10,9% (рис. 3). Vársepa та ін. також показали, що в плацентарній тканині, але на 21-му тижні гестації, CD34⁺CD45^{low}-клітини експресують CD235 і EpoR. При цьому багато з них не експресували CD235, що може свідчити про належність до ранніх еритроїдних прогеніторів; були також присутні клітини, що експресували CD235, EpoR, CD71, та різний рівень CD34, що вказує на наявність у плаценті проміжних еритроїдних попередників пізніх стадій комітування [2]. Як показано раніше, кінцеве дозрівання та енуклеація ранніх незрілих червоних клітин крові людини відбувається на першому триместрі вагітності в плацентарних ворсинках, при цьому примітивні еритроїдні клітини було знайдено у ворсинках хоріона між 5–7-ми тижнями розвитку [18]. Таким чином, нами встановлено, що еритропоез продовжується до кінцевого терміну вагітності.

Ми виявили, що зріла плацентарна тканина, як і пуповинна кров, містить Т-лімфоїдні та/або NK-прогенітори з фенотипом CD34⁺CD45^{low}CD7⁺SSC^{low}, їх вміст серед усіх ГПК становив 6,3% (0,6–17,3%, $n = 6$, $P < 0,05$) та 2,8% (1,5–4,5%, $n = 6$, $P < 0,05$) відповідно (рис. 5). Як відомо, CD7 вважається найбільш раннім маркером Т-клітинної диференціації і детектується на Т-клітинах-прогеніторах [24, 25]. Лімфоїдні комітовані прогенітори з фенотипом CD34⁺CD7⁺ є клітинами, що заселяють тимус [26], але експресія CD7 є характерною не лише для Т-клітин-прогеніторів, але й для В-лімфоїдних [27] та мієлоїдних клітин-прогеніторів дорослого кісткового мозку і фетальної печінки [25]. Однак CD34⁺CD7⁺-популяція містить лише мінорну субпопуляцію клітин, комітованих у мієлоїдному напрямі, що підтверджує тест на колонієутворювальну активність (CFU) та здатність до продукування гранулоцитів у культурах із тривалою підтримкою [28]. CD34⁺CD7⁺-популяція збагачена на клітини, що перебувають на стадії проміжного етапу диференціювання в NK клітини [5], яка є ранньою стадією в комітуванні гемопоетичних прогеніторів в NK-напрямі [29].

Показано коекспресію CD34 і CD7 на клітинах пуповинної крові, кісткового мозку та мобілізованої периферичної крові [21]. У пуповинній крові виявлено більший вміст клітин із фенотипом CD34⁺CD7⁺, ніж у кістковому мозку й периферичній крові [30, 31], при цьому в кістковому мозку та периферичній крові він є однаковим [32]. Водночас однакову кількість CD34⁺CD7⁺-клітин

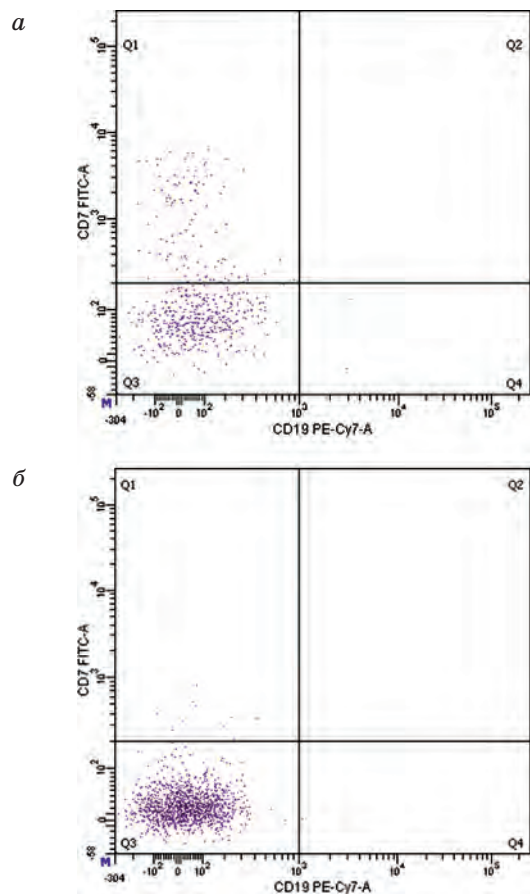


Рис. 5. Двовимірні гістограми експресії поверхневих маркерів CD19 та CD7 на клітинах із фенотипом $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$ тканини: плаценти (а) та пуповинної крові (б)

фіксували і в пуповинній крові, кістковому мозку та периферичній крові [21]. За нашими підрахунками, 27,1% (14,6–41,8%) $CD7^+CD45^+$ та 10,1% (5,9–15,2%) $CD7^+CD45RA^+CD45^+$ -клітин присутні у фракції плацентарних клітин, очищених на фіколі. CD45RA експресується як на лімфоїдних, так і на грануломоноцитарних прогеніторних клітинах [33], а також на «ненавчених» Т-лімфоцитах, які втрачають його експресію, коли стають клітинами пам'яті [34]. Várcseny та ін. не знаходили на 22-му тижні гестації в плацентарній $CD45^+$ -популяції клітин Т-лімфоцитів із маркером CD3 і фіксували дуже мало НК-клітин із маркером CD56 [2]. При цьому Т-клітини не виявляли починаючи з 12,5 тижнів гестації до 39,5 тижнів, а кількість НК-клітин становила від 0,05 до 3,5% упродовж 10–39,5 тижнів гестації. Отже, у зрілій плаценті знайдено попередники Т-лімфоцитів і К-клітини із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD7^+SSC^{low}$, а також зрілі Т-лімфоцити і Т-лімфоцити на проміжних стадіях дозрівання з фено-

типами $CD7^+CD45^+$ та $CD7^+CD45RA^+CD45^+$ відповідно. Ми стверджуємо, що ці клітини містяться в тканині, а не є залишками пуповинної крові, про що свідчить у 10 разів вищий вміст клітин із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD7^+SSC^{low}$ у деяких зразках плаценти. Загалом виявлено тенденцію до більшого вмісту попередників Т-лімфоцитів/НК-клітин у зрілій плацентарній тканині, ніж у пуповинній крові, однак достовірної різниці їх кількості немає, можливо у зв'язку з відносно малою вибіркою (рис. 1).

Спостерігали незначний вміст В-лімфоїдних прогеніторів у зрілій плацентарній тканині та пуповинній крові з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD19^+SSC^{low}$, їх кількість серед усіх ГПК становила 0,5% (0,1–1,0%, $n = 6$, $P < 0,05$) та 0,7% (0,05–2,2%, $n = 6$, $P < 0,05$) відповідно (рис. 5). CD19 — маркер В-лімфоїдних клітин, що з'являється дуже рано й не зникає на пізніх стадіях дозрівання [23, 35–37]. Порівнюючи такі джерела ГПК, як кістковий мозок, пуповинна та периферична кров, найбільший вміст В-лімфоїдних прогеніторів із фенотипом $CD34^+CD19^+$ знаходили в кістковому мозку [21, 38, 31]. На 12–19-му тижні гестації $CD34^{++}CD45^{low}$ -клітини фетального хоріона в спеціальному середовищі для лімфоїдних клітин утворювали незначну кількість CD19-клітин.

Плацента містить попередники гемопоетичних клітин, які на 14-ту добу культивування дають початок колоніям: еритроїдних попередників BFU-E (burst-forming unit-erythroid), CFU-E (colony forming unit-erythroid); попередників гранулоцитів та моноцитів CFU-M (colony-forming unit-macrophage), CFU-G (colony-forming unit-granulocyte), CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte, macrophage) і змішаним колоніям CFU-GEMM (colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte) (рис. 6). До того ж, як ми встановили раніше, колонієутворювальна активність ГПК зрілої плацентарної тканини зберігається і після кріоконсервування тканини [39].

Порівняння кількості клітин, що утворюють різні типи колоній, показало, що їх рівень у плацентарній тканині та пуповинній крові достовірно не відрізняється, на відміну від даних, отриманих за фенотипування, що свідчить про схожий диференціувальний потенціал ГПК плаценти та пуповинної крові (рис. 7). Є дані, що $CD34^+CD45^{low}$, ізольовані зі зрілої плаценти, продукують незначну кількість еритроїдних колоній, тимчасом як гемопоетичні клітини першого

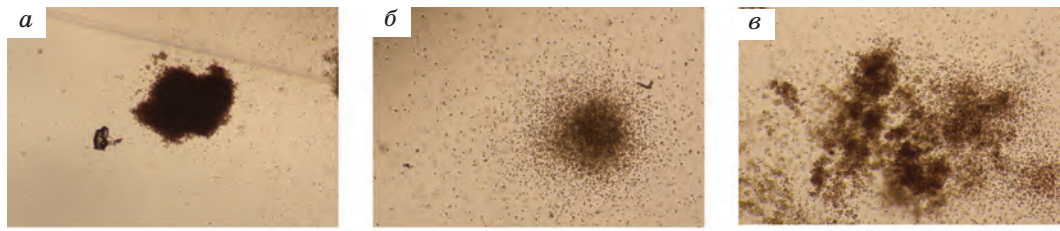


Рис. 6. Колонії клітин плацентарної тканини:
а — CFU-B; б — CFU-GM; в — CFU-GEMM, світлова мікроскопія, ок. $\times 10$, об. $\times 5$

і другого триместру не генерують чисті еритроїдні колонії, що вказує на якісну різницю у властивостях плацентарних прогениторів гемопоетичних клітин ранньої та зрілої плаценти [2]. Проте інші автори відзначають, що частота виявлення CFU-B залишається однаковою серед клітин із плаценти 6-, 9-, 15-го тижня гестації, і спостерігають істотне збільшення кількості CFU-GM, CFU-Mix колоній починаючи з 9-го тижня [40]. Показано, що при цьому практично всі колонії (понад 90%) були фетального походження [3].

Результати фенотипового аналізу ГПК, які показали наявність у плаценті мієлоїдних, еритроїдних, Т-лімфоїдних, В-лімфоїдних попередників і високий колонієутворювальний потенціал, свідчать про те, що в зрілій плаценті активно проходить гемопоєз. За результатами роботи можна припустити, що використання ГПК пуповинної крові разом із клітинами зрілої плацентарної тканини для трансплантацій дасть змогу усунути декілька недоліків пуповинної крові, що пов'язані з недостатньою кількістю зібраних клітин і тривалим часом відновлення нормального рівня нейтрофілів, тромбоцитів та утворення лімфоцитів. Це можливо, оскільки, на відміну від пуповинної крові, у плацентарній тканині більший вміст комітованих у мієлоїдному напрямі клітин і наявна велика кількість більш пізніх мієлоїдних прогениторів із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$. Встановлена тенденція до вищого вмісту Т-лімфоїдних прогениторів із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD7^+SSC^{low}$ у плаценті порівняно з пуповинною кров'ю також є безперечною перевагою цієї популяції клітин, оскільки однією із основних проблем під час трансплантації пуповинної крові є затримка відновлення лімфопоєзу.

Таким чином з'ясовано, що більшість ГПК як у плаценті, так і в пуповинній крові залишаються незрілими, однак при цьому вміст лінійно-комітованих клітин у плацентарній тканині достовірно ви-

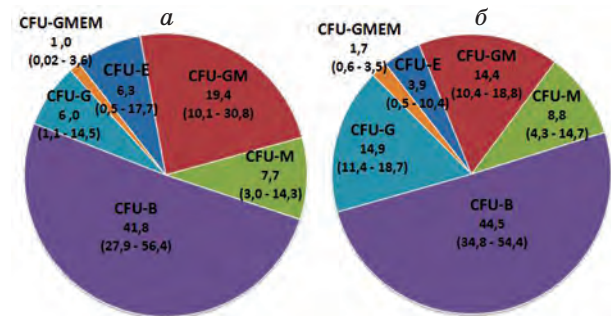


Рис. 7. Колонієутворювальний потенціал клітин плацентарної тканини (а) та пуповинної крові (б) *in vitro*, n (плацент) = 6, n (пуповинної крові) = 10 (значення наведено у відсотках)

щий. Більшість з усіх комітованих в різних напрямках прогениторів серед пуповинної крові припадає на популяцію ранніх мієлоїдних попередників із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD33^+SSC^{low}$, а в плаценті — на більш пізні мієлоїдні прогенітори з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$, вміст яких у пуповинній крові незначний. У плацентарній тканині вміст еритроїдних прогениторів із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD235^+SSC^{low}$ достовірно вищий. У зрілій плаценті присутні Т-лімфоїдні прогенітори/NK-прогенітори з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD7^+SSC^{low}$, а також Т-лімфоцити на різних стадіях дозрівання з фенотипами $CD7^+CD45^+$ та $CD7^+CD45RA^+CD45^+$ відповідно. Ми виявили незначну кількість В-лімфоїдних прогениторів у зрілій плацентарній тканині та пуповинній крові з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD19^+SSC^{low}$. За умов культури ГПК плацентарної тканини мають подібний до клітин пуповинної крові мультипотентний потенціал, утворюючи при цьому колонії CFU-B, CFU-E, CFU-M, CFU-G, CFU-GM, CFU-GMEM в однаковому співвідношенні. Наявність у плацентарній тканині кровотворних клітин на різних стадіях та напрямках диференціювання свідчить про те, що в плаценті відбувається гемопоєз протягом усього терміну гестації.

REFERENCES

1. Broxmeyer H. E., Farag S. Background and future considerations for human cord blood hematopoietic cell transplantation, including economic concerns. *Stem Cells Developt.* 2013, 22(1), 103–110.
2. Bárcena 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. *Dev Biol.* 2009, 327(1), 24–33.
3. 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. (Maywood).* 2009, 234(7), 813–823.
4. Gaipa G., Coustan-Smith E., Todisco E., Maglia O., Biondi A., Campana D. Characterization of CD34⁺, CD13⁺, CD33⁻ cells, a rare subset of immature human hematopoietic cells. *Haematologica.* 2002, 87(4), 347–356.
5. Carvalho J. M., Souza M. K., Buccheri V., Rubens C. V., Kerbauy J., Oliveira J. S. CD34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogenic donors. *Sao Paulo Med J.* 2009, 127(1), 12–18.
6. Terstappen L. W., Huang S., Safford M., Lansdorp P. M., Loken M. R. Sequential Generations of Hematopoietic Colonies Derived From Single Nonlineage-Committed CD34⁺CD38⁻ Progenitor Cells. *Blood.* 1991, 77(6), 1218–1227.
7. Boezeman J., Raymakers R., Vierwinden G., Linssen P. Automatic analysis of growth onset, growth rate and colony size of individual bone marrow progenitors. *Cytometry.* 1997, 28(4), 305–310.
8. Thoma S. J., Lamping C. P., Ziegler B. L. Phenotype analysis of hematopoietic CD34⁺ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction. *Blood.* 1994, 83(8), 2103–2114.
9. D'Arena G., Musto P., Cascavilla N., Di Giorgio G., Zendoli F., Carotenuto M. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cell. *Haematologica.* 1996, 81(5), 404–409.
10. Terstappen L. W., Hollander Z., Meiners H., Loken M. R. Quantitative Comparison of Myeloid Antigens on Five Lineages of Mature Peripheral Blood Cells. *J. Leukoc. Biol.* 1990, 48(2), 138–148.
11. Antal-Szalmas P., Strijp J. A., Weersink A. J., Verhoef J., Van Kessel K. P. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1997, 61(6), 721–728.
12. Prokopovych S. K., Vinnitzkiy S. K. Dendritic cells and prospects of their use in immunotherapy of cancer. *Oncologiya.* 2001, 3(2–3), 126–131. (In Russian).
13. Lathers D. M., Lubbers E., Wright M. A., Young M. R. Dendritic cell differentiation pathways of CD34⁺ cells from the peripheral blood of head and neck cancer patients. *J. Leukoc. Biol.* 1999, 65(5), 623–628.
14. Perez S. A., Sotiropoulou P. A., Gkika D. G., Mahaira L. G., Niarchos D. K., Gritzapis A. D., Kavalakis Y. G., Antsaklis A. I., Baxevas C. N., Papamichail P. A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood. *Blood.* 2003, 101(9), 3444–3450.
15. Egeland T., Steen R., Quarsten H., Gaudernack G., Yang Y. C., Thorsby E. Myeloid differentiation of purified CD34⁺ cells after stimulation with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte-CSF, monocyte-CSF, and interleukin-3. *Blood.* 1991, 178(12), 3192–3199.
16. Bender J. G., Unverzagt K. L., Walker D. E., Lee W., Van Epps D. E., Smith D. H., Stewart C. C., To L. B. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood.* 1991, 77(12), 2591–2596.
17. Kuchma M., Shablii V., Kyryk V., Onishchenko A., Shablii Yu., Lukash L., Lobintseva G. Phenotypic heterogeneity of hematopoietic progenitor cells from placental tissue comparative analysis with umbilical cord blood and fetal liver. *Cell Organ Transplant.* 2013, 1(1), 66–69.
18. Van Handel B., Prashad S. L., Hassanzadeh-Kiabi N., Huang A., Magnusson M., Atanassova B., Chen A., Hamalainen E. I., Mikkola H. K. The first trimester human placenta is a site for terminal maturation of primitive erythroid cells. *Blood.* 2010, 116(17), 3321–3330.
19. Loken M. R., Shah V. O., Dattilio K. L., Civin C. I. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood.* 1987, 69(1), 255–263.
20. Klimchenko O., Mori M., Distefano A., Langlois T., Larbret F., Lecluse Y., Feraud O., Vainchenker W., Norol F., Debili N. A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood.* 2009, 114(8), 1506–1517.
21. Fritsch G., Stimpfl M., Kurz G., Printz D., Buchinger P., Fischmeister G., Hoecker P., Gadner H. The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 1996, 17(2), 169–78.

22. Okumura N., Tsuji K., Nakahata T. Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. *Blood*. 1992, 80(3), 642–650.
23. Rappold I., Ziegler B. L., Köhler I., Marchetto S., Rosnet O., Birnbaum D., Simmons P. J., Zannettino A. C., Hill B., Neu S., Knapp W., Alitalo R., Alitalo K., Ullrich A., Kanz L., Bühring H. J. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood*. 1997, 90(1), 111–125.
24. Haynes B. F., Denning S. M., Singer K. H., Kurtzberg J. Ontogeny of T-cell precursors: A model for the initial stages of human T-cell development. *Immunol. Today*. 1989, 10(3), 87–91.
25. Bárcena A., Muench M. O., Roncarolo M. G., Spits H. Tracing the expression of CD7 and other antigens during T- and myeloid-cell differentiation in the human fetal liver and thymus. *Leuk Lymphoma*. 1995, 17(1–2), 1–11.
26. Schmitt C., Ktorza S., Sarun S., Verpillieux M. P., Blanc C., Deugnier M. A., Dal-loul A., Debr P. CD34-positive early stages of human T-cell differentiation. *Leuk. Lymphoma*. 1995, 17(1–2), 43–50.
27. Grümayer E. R., Griesinger F., Hummel D. S., Bruning R. D., Kersey J. H. Identification of Novel B-Lineage Cells in Human Fetal Bone Marrow That Coexpress CD7. *Blood*. 1991, 77(1), 64–68.
28. Chabannon C., Wood P., Torok-Storb B. Expression of CD7 on normal human myeloid progenitors. *J. Immunol.* 1992, 149(6), 2110–2113.
29. Miller J. S., Alley K. A., Mc Glave P. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34⁺7⁺ NK progenitor. *Blood*. 1994, 83(9), 2594–2601.
30. Bender J. G., Unverzagt K., Walker D. E., Lee W., Smith S., Williams S., van Epps D. E. Phenotypic analysis and characterization of CD34⁺ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1994, 70(1), 10–8.
31. Steen R., Tjønnfjord G. E., Egeland T. Comparison of the phenotype and clonogenicity of normal CD34⁺ cells from umbilical cord blood, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and adult human bone marrow. *J. Hematother.* 1994, 3(4), 253–262.
32. Bender J. G., Unverzagt K. L., Walker D. E., Lee W., van Epps D. E., Smith D. H., Stewart C. C., To L. B. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood*. 1991, 77(12), 2591–2596.
33. Olweus J., Lund-Johansen F., Terstappen L. CD64IFcyRI Is a Granulo-monocytic Lineage Marker on CD34 Hematopoietic Progenitor Cells. *Blood*. 1995, 85(9), 2402–2413.
34. Carrasco J., Godelaine D., van Pel A., Boon T., van der Bruggen P. CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. *Blood*. 2006, 108(9), 2897–2905.
35. Loken M. R., Shah V. O., Dattilio K. L., Civin C. I. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte. *Blood*. 1987, 70(5), 1316–1324.
36. Nadler L. M., Anderson K. C., Marti G., Bates M., Park E., Daley J. F., Schlossman S. F. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J. Immunol.* 1983, 131(1), 244–50.
37. Loken M. R., Shah V. O., Dattilio K. L., Civin C. I. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood*. 1987, 70(5), 1316–1324.
38. Van Epps D. E., Bender J., Lee W., Schilling M., Smith A., Smith S., Unverzagt K., Law P., Burgess J. Harvesting, characterization, and culture of CD34⁺ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells*. 1994, 20(2–3), 411–423.
39. Shablii V. A., Kuchma M. D., Kyryk V. M., Onishchenko A. N., Lukash L. L., Lobyn-tseva G. S. Cryopreservation human placental tissue as source of hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Kletochnaia transplantologii i tkanevaia inzheneriia*. 2012, 7(1), 54–62. (In Russian).
40. Robin C., Bollerot K., Mendes S., Haak E., Crisan M., Cerisoli F., Lauw I., Kaimakis P., Jorna R., Vermeulen M., Kayser M., van der Linden R., Imanirad P., Verstegen M., Nawaz-Yousaf H., Papazian N., Steegers E., Cupedo T., Dzierzak E. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Stem Cell*. 2009, 5(4), 385–395.

**ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ
КЛЕТКИ ПЛАЦЕНТЫ И ПУПОВИННОЙ
КРОВИ: ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ И ПОТЕНЦИАЛ
К ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *in vitro***

М. Д. Кучма^{1,2}, В. А. Шаблій^{1,2}, В. М. Кирик³,
А. Н. Свитина², Ю. Н. Шаблій²,
Ю. К. Прокопец², Т. М. Индыченко²,
Л. Л. Лукаш¹, Г. С. Лобынцева²

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Институт клеточной терапии, Киев, Украина

³ГУ «Институт генетической и регенеративной
медицины НАМНУ», Киев, Украина

E-mail: k.maria@ua.fm

Целью работы было сравнительное исследование характера дифференцировки гемопоэтических прогениторных клеток плаценты и пуповинной крови *in vivo* и их мультипотентных свойств *in vitro*. Использовали методы выделения фракции мононуклеарных клеток из пуповинной крови, ткани зрелой плаценты и фетального хориона, проточной цитометрии и анализа потенциала к дифференциации. Установлено, что большинство гемопоэтических прогениторных клеток как в зрелой плаценте, так и в пуповинной крови остаются незрелыми элементами, но при этом в плацентарной ткани обнаружено большее содержание линейно-коммитированных клеток, среди которых: миелоидные предшественники с фенотипом CD34⁺CD45^{low}CD33⁺SSC^{low}, более поздние миелоидные прогениторы с фенотипом CD34⁺CD45^{low}CD14⁺SSC^{low} (содержание достоверно выше, чем в пуповинной крови), эритроидные прогениторы с фенотипом CD34⁺CD45^{low}CD235⁺SSC^{low} (содержание достоверно выше, чем в пуповинной крови), В-лимфоидные прогениторы с фенотипом CD34⁺CD45^{low}CD19⁺SSC^{low}, Т-лимфоидные прогениторы и Natural Killer Cells-прогениторы с фенотипом CD34⁺CD45^{low}CD7⁺SSC^{low}, а также зрелые Т-лимфоциты на разных стадиях созревания с фенотипами CD7⁺CD45⁺ и CD7⁺CD45RA⁺CD45⁺ соответственно. В условиях *in vitro* гемопоэтические прогениторные клетки плацентарной ткани имеют сходный с клетками пуповинной крови мультипотентный потенциал. Наличие в плацентарной ткани кроветворных клеток на разных стадиях и направлениях дифференцировки свидетельствует о том, что в плаценте происходит гемопоэз на протяжении всего срока гестации.

Ключевые слова: плацентарный гемопоэз, гемопоэтические прогениторные клетки.

**HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS
OF PLACENTAL AND UMBILICAL CORD
BLOOD: IMMUNOPHENOTYPIC ANALYSIS
AND DIFFERENTIATION POTENTIAL
*in vitro***

М. Д. Кучма^{1,2}, В. А. Шаблій^{1,2}, В. М. Кирчик³,
А. Н. Свитина², Ю. Н. Шаблій², Ю. К. Прокопета²,
Т. М. Индыченко², Л. Л. Лукаш¹,
Г. С. Лобынцева²

¹Institute of Molecular Biology and Genetics,
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²Institute of Cellular Therapy, Kyiv, Ukraine

³State Organization «Institute of Genetic and
Regenerative Medicine of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv

E-mail: k.maria@ua.fm

The aim of the work was the comparative studying of the character of differentiation of hematopoietic progenitor cells of the placenta and umbilical cord blood *in vivo* and their multipotent properties *in vitro*. The proposed methods were used for mononuclear cells isolation from umbilical cord blood, placental tissue and mature fetal chorion, of flow cytometry and of analysis of the potential for differentiation. We found that majority of hematopoietic progenitor cells both in mature placenta and umbilical cord blood remains uncommitted, however in placental tissue we found more amount of differentiated cells that include myeloid progenitor with a phenotype CD34⁺CD45^{low}CD33⁺SSC^{low}, later myeloid progenitors with a phenotype CD34⁺CD45^{low}CD14⁺SSC^{low} (their content is significantly higher than in cord blood), erythroid progenitors with a phenotype CD34⁺CD45^{low}CD235⁺SSC^{low} (their number significantly above than that in cord blood), B-lymphoid progenitors with a phenotype CD34⁺CD45^{low}CD19⁺SSC^{low}, T-lymphoid progenitors and Natural Killer Cells-progenitors with a phenotype CD34⁺CD45^{low}CD7⁺SSC^{low}, and also T-lymphocytes at the different stages of maturation with a phenotypes CD7⁺CD45⁺ and CD7⁺CD45RA⁺CD45⁺ respectively. Placental hematopoietic progenitor cells have similar potential for differentiation *in vitro* in comparison with cord blood ones. Presence of hematopoietic cells in placental tissue at different stages and lines of differentiation suggests that the placental hematopoiesis last during all term of gestation.

Key words: placental hematopoiesis, hematopoietic progenitor cells.