

УДК 576-57.085.2:618.36+612.356

Кучма М. Д.^{1,2}, Шаблій В. А.^{1,2}, Кирик В. М.³, Онищенко А. Н.², Шаблій Ю. Н.², Лукаш Л. Л.¹, Лобынцева Г. С.²¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна²Інститут клітинної терапії, Київ, Україна³ГУ «Інститут генетическої і регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ТКАНИ ПЛАЦЕНТЫ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ С ПУПОВИННОЙ КРОВЬЮ И ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНЬЮ

РЕЗЮМЕ

Исследование плацентарных гемопоэтических прогениторных клеток (ГПК) и сравнение их со свойствами ГПК фетальных тканей и взрослого организма необходимы для оценки возможности их клинического применения. Было показано, что ГПК, выделенные из плаценты, гетерогенны по фенотипу: плацентарная ткань содержит три популяции с различным уровнем экспрессии *CD34*: *CD34⁺⁺⁺CD45^{low}*, *CD34⁺⁺CD45^{low}* и *CD34^{+/low}CD45^{low}*. Как и в фетальной печени, в плаценте содержатся популяции с фенотипом *CD34⁺⁺⁺CD45^{low/-}* и *CD34⁺CD45^{low/-}*, что позволяет говорить о кроветворении в плацентарной ткани. *CD34⁺⁺⁺CD45^{low/-}* популяция также экспрессирует *CD133*, практически отрицательна по линейным маркерам и имеет лимфоцитоподобную морфологию. Это свидетельствует о том, что такая популяция содержит примитивные ГПК. Также среди плацентарных клеток присутствуют более поздние прогениторы с фенотипом *CD34^{+/low}CD45⁺* и большинство их экспрессирует гемопоэтические линейные маркеры. Популяция с фенотипом *CD34⁺⁺⁺CD45^{low}* наблюдается только в плаценте. Клетки с таким фенотипом, предположительно, образуются в плацентарной ткани и/или мигрируют из других сайтов кроветворения, приобретая при этом такой иммунофенотип под воздействием плацентарного микроокружения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гемопоэтические прогениторные клетки, плацентарный гемопоэз, экспрессия *CD34*, пуповинная кровь.

В настоящее время серьезной проблемой гематологии остается дефицит доноров гемопоэтических прогениторных клеток (ГПК) для трансплантации при онкогематологических заболеваниях и врожденных нарушениях кроветворения, поэтому поиск новых дополнительных источников ГПК важен для медицины. Было показано, что плацента человека играет важную роль в эмбриональном гемопоэзе [3, 9]. В то же время иммунофенотип плацентарных ГПК и их мультипотентность все еще недостаточно изучены. Исследование плацентарных ГПК и сравнение их свойств со свойствами фетальных ГПК и ГПК взрослого организма необходимы для оценки возможности их клинического применения. Таким образом, целью данной работы было сравнительное исследование фенотипа ГПК, выделенных из ткани плаценты, пуповинной крови и фетальной печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ИЗ КОРДОВОЙ КРОВИ И ТКАНИ ПЛАЦЕНТЫ

Плаценту получали после родов (физиологических или путем кесарева сечения) на 39-41 неделе беременности у 23-36-летних женщин с их информированного согласия. Кордовую кровь собирали по стандартной методике забора пуповинной крови, тестировали на наличие аэробных, анаэробных микроорганизмов, а также на наличие грибковой инфекции; материнскую кровь – на *HIV-1/2*, *HCV*, *HBV*, *CMV* и *Treponema pallidum*. Ткань плаценты дополнительно тестировали на

наличие *Chlamidium trachomatis*, *Mycoplasma genitalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *HSV-1/2*, *CMV*. Пуповину отрезали, плаценту очищали от амниотической и децидуальной оболочек. Плацентарную ткань измельчали стерильными ножницами на фрагменты 1-3 мм, которые промывали раствором Хенкса для удаления остатков крови до полного обесцвечивания промывающего раствора. Затем ткань обрабатывали раствором ферментов: 0,2% коллагеназы I (*Serva*, Германия), 0,35 мг/мл гиалуронидазы (*Sigma*, США), 100 ед/мл *DNase I* (*Sigma*, США) с добавлением 1 мг/мл *BSA* в течение 30-50 мин при +37 °С. После этого плацентарные клетки собирали путем фильтрации через 70 мкм клеточный фильтр (*Becton Dickinson*, США). Оставшуюся ткань инкубировали со свежей порцией ферментов в течение 30-60 мин при +37 °С. Клетки также отмывали и объединяли. Фракцию мононуклеарных клеток из плаценты и кордовой крови получали путем фракционирования в градиенте плотности фиколла (плотность 1,077г/мл, *Biochrome*, Germany), дважды отмывали от фиколла, фильтровали через клеточный фильтр с диаметром пор 40 мкм. Мононуклеарные клетки из кордовой крови обрабатывали такой же смесью ферментов, как и ткань плаценты в течение 50 мин при 37 °С и отмывали от остатков ферментов в *PBS* с добавлением 1 мг/мл *BSA*.

ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ

Источником фетальной печени были абортивные эмбрионы человека 7-12 недель гестации, полученные в результате добровольного прерывания беременности с информированного согласия женщин. Суспензию клеток фетальной печени получали неферментативным методом, путем гомогенизации в гомогенизаторе Поттера в растворе Хенкса с последующим фильтрованием через клеточный фильтр с диаметром пор 100 мкм. Криоконсервирование суспензии клеток печени проводили по трехэтапной программе по методике Г. С. Лобынцева [1]. Хранили замороженные образцы в жидком

азоте при температуре -196 °С. Клетки фетальной печени размораживали на водяной бане при температуре +40 °С.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

Для иммунофенотипирования плацентарных клеток, клеток кордовой крови и фетальной печени использовали следующие флуорохром-меченные моноклональные антитела (*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*. Иммунофенотипирование проводили на лазерном проточном цитофлуориметре-сортере *BD FACSAria* (*Becton Dickinson*, США) с помощью программы *FACS Diva 6.1*, анализируя одновременно 2 параметра светорассеяния и 6 параметров флуоресценции. Для настройки компенсации перекрытия спектров эмиссии флуорохромов при многопараметрическом анализе использовали контрольные образцы клеток без внесения антител (*unstained control*), образцы с каждым из антител отдельно (*single stained control*) и образцы с комбинацией нескольких антител без одного (*fluorescence minus one control*).

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Результаты представлены в виде средних величин с 95%-ным доверительным интервалом. Статистическую значимость различий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущем исследовании мы продемонстрировали, что ISHAGE протокол подходит для *FACS* анализа ГПК, которые получены из нативной и криоконсервированной плацентарной ткани [2]. Анализ по такому протоколу показал, что содержание ГПК с фенотипом $CD34^+CD45^{dim}$ и лимфоцитоподобной морфологией (SSC^{low}) среди

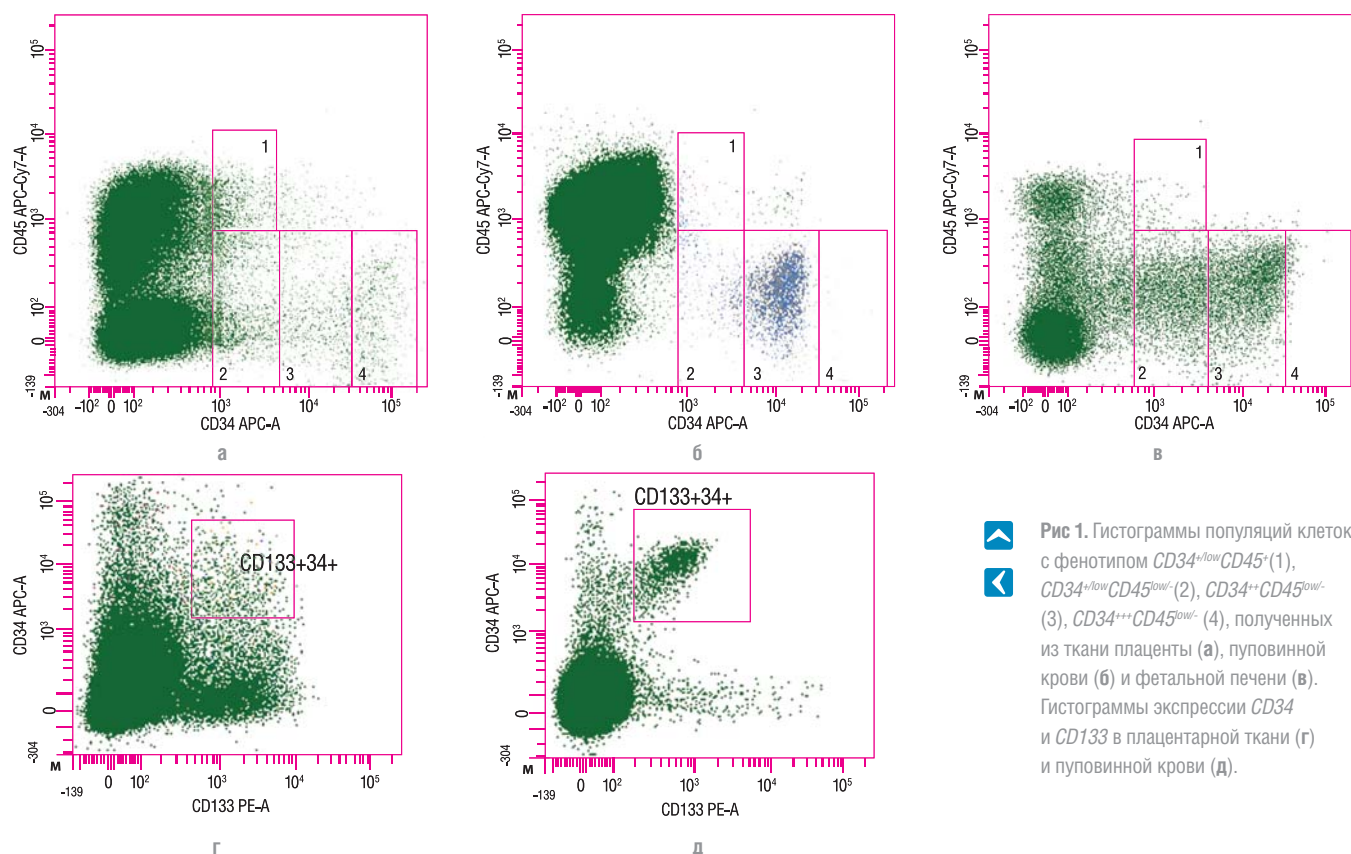


Рис 1. Гистограммы популяций клеток с фенотипом $CD34^{+low}CD45^{+}$ (1), $CD34^{+low}CD45^{low-}$ (2), $CD34^{++}CD45^{low-}$ (3), $CD34^{+++}CD45^{low-}$ (4), полученных из ткани плаценты (а), пуповинной крови (б) и фетальной печени (в). Гистограммы экспрессии *CD34* и *CD133* в плацентарной ткани (г) и пуповинной крови (д).

жизнеспособных $CD45^+$ клеток из плацентарной ткани составляет 0,6% (0,39-0,86%, $n = 13$). Количество $CD34^+CD45^{dim}SSC^{low}$ клеток среди $CD34^+CD45^{dim}$ составляло 78,5% (70,5-85,6%, $n=13$). Мы выявили, что плацентарная ткань содержит три популяции, которые отличаются по уровню экспрессии $CD34$ и обозначили их как: $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$ и $CD34^{+++}CD45^{low/-}$.

Две популяции: $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ и $CD34^{++/low}CD45^{low/-}$ присутствовали как в плацентарной ткани, так и в пуповинной крови и фетальной печени (рис. 1 а, б, в). $CD34^{++}CD45^{low/-}$ клетки, а также часть популяции $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ в плацентарной ткани, также как и в пуповинной крови, были положительными по $CD133$ (рис. 1 в, г). Уровень экспрессии $CD14$ на плацентарных клетках с фенотипом $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ и $CD34^{++}CD45^{low/-}$ составлял 7,2% (3,3-12,6%, $n = 4$) и 3% (0,5-7,6%, $n=4$) соответственно, в отличие от тех же популяций клеток пуповинной крови, где он почти не экспрессировался. Популяция клеток с фенотипом $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ присутствовала в плацентарной ткани, но в то же время практически не наблюдалась в пуповинной крови и фетальной печени (рис. 1 а-в).

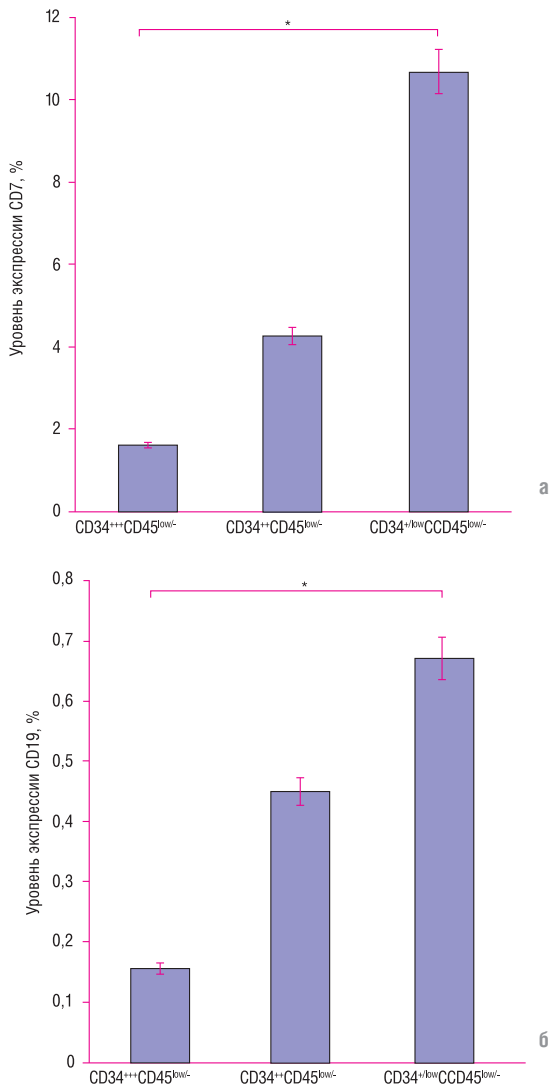


Рис. 2. Диаграммы уровней экспрессии $CD7$ (а) и $CD19$ (б) на разных популяциях ГПК: $CD34^{+++}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, * - $P<0,05$, $n=6$.

Количество $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ клеток среди всех клеток, очищенных на фиколле, составило 0,28% (0,05-0,7) в плацентарной ткани и 0,006% (0,003-0,01%) в крови. FASC анализ показал, что $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ клетки, выделенные из плацентарной ткани, в целом имеют лимфоцитоподобную морфологию ($FSC^{low}SSC^{low}$), тогда как $CD34^+CD45^{low/-}$ и $CD34^{++}CD45^{low}$ клетки очень гетерогенны по морфологии, при этом увеличение экспрессии $CD45$ на $CD34^+$ -клетках характерно для клеток больших размеров и гранулярности. Мультипараметрический анализ проточной цитометрии показал, что $CD34^{+++}CD45^{low}$ клетки имеют следующий иммунофенотип: $CD33^{-/low}CD14^{-/low}CD235^{-}CD19^{-}CD7^{-/low}CD45RA^+$. Уровень экспрессии $CD14$ на $CD34^{+++}CD45^{low}$ плацентарных клетках составлял 4,3% (1,5-8,4%, $n = 4$). Экспрессия $CD14$ увеличивалась с уменьшением уровня экспрессии $CD34$ на $CD45^{low/-}$ клетках плацентарной ткани. Подобным образом экспрессия $CD7$ и $CD19$ увеличивалась с уменьшением уровня экспрессии $CD34$ на $CD45^{low/-}$ клетках плацентарной ткани и пуповинной крови (рис. 2).

В отличие от пуповинной крови и фетальной печени, плацента содержала еще и $CD34^{+/low}CD45^+$ клетки. Эта популяция характеризовалась более высоким уровнем экспрессии линейных маркеров по сравнению с популяцией с более низким уровнем $CD45$ и с более высоким уровнем $CD34$. Содержание миелоидных прогениторов ($CD14^+CD33^+$) среди клеток $CD34^{+/low}CD45^+$ составляло 73,5% (54,2-88,4%, $n = 4$), а лимфоидных ($CD19^+$ и $CD7^+$) среди этой же популяции было 14,2% (8,4-21,2%, $n = 4$) и 3% (1,4-5,2%, $n=4$) соответственно. Более того, мы отмечали, что содержание миелоидных прогениторов ($CD14^+CD33^+$) было выше среди плацентарных ГПК с более высоким уровнем экспрессии $CD45$ и более низким $CD34$ (рис. 3).

Анализ фенотипа фракции мононуклеарных клеток плаценты еще раз подтвердил, что ткань плаценты содержит гемопоэтические прогениторные клетки. Процент $CD34^+CD45^{dim}SSC^{low}$ клеток среди $CD34^+CD45^{dim}$, который ниже, чем в пуповинной крови, свидетельствует о необходимости гейтирования $CD34^+CD45^{dim}$ клеток по морфологии, как описано в предыдущей нашей работе [2].

Плацентарная ткань содержит ГПК с различным уровнем экспрессии $CD34$. Возможно, это свидетельствует о различных стадиях незрелости этих клеток. Подобно фетальной печени, плацента содержит популяции $CD34^{++}CD45^{low/-}$ и $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ клеток, что может свидетельствовать о процессе кроветворения в плацентарной ткани. С другой стороны, среди клеток плаценты присутствуют и более зрелые ГПК с фенотипом $CD34^{+/low}CD45^+$. Большинство таких клеток экспрессируют гемопоэтические линейные маркеры, что может позволить причислить их к более поздним предшественникам. Мы показали, что экспрессия линейных маркеров, таких как $CD14$, $CD19$,

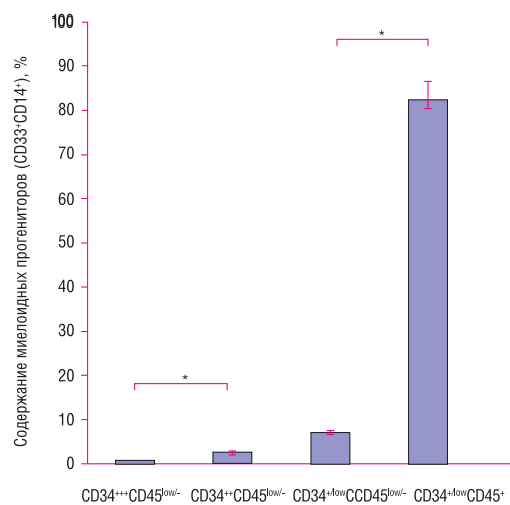


Рис. 3. Диаграмма содержания миелоидных прогениторов ($CD33^+CD14^+$) среди разных популяций ГПК плацентарной ткани: $CD34^{+++}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, $CD34^{+/low}CD45^+$. * - $P<0,05$, $n=6$.

CD7, увеличивается на ГПК с уменьшением уровня экспрессии *CD34*. Поскольку в зрелой плацентарной ткани мы находим прогениторные клетки различных стадий дифференцировки, можно говорить о том, что такие клетки продолжают образовываться в плаценте и/или мигрировать в плацентарную ткань и не исчезают до момента рождения ребенка.

Также нами показано, что *CD133* в большей степени экспрессируется *CD34⁺⁺CD45^{low/-}* клетками плаценты и пуповинной крови, свидетельствуя о том, что такая популяция клеток очень ранняя. Это подтвердилось и тем, что уровень экспрессии линейных маркеров *CD33*, *CD235*, *CD19*, *CD7* и *CD45RA* был на грани отсутствия, однако часть клеток в этой популяции экспрессировали *CD14*. Интересно, что плацента содержит *CD34⁺⁺⁺CD45^{low/-}* клетки, которые так же, как *CD34⁺⁺CD45^{low/-}*, не экспрессируют линейные маркеры, но в отличие от *CD34⁺⁺CD45^{low/-}* они не несут маркер стволовых клеток *CD133* и имеют гетерогенную морфологию. Отсутствие таких клеток в пуповинной крови и фетальной печени свидетельствует о том, что они, возможно, образуются в плацентарной ткани или мигрируют из других сайтов органов кроветворения и изменяются под влиянием плацентарного микроокружения. Мы предполагаем, что популяция плацентарных ГПК, которые имеют очень высокий уровень белка межклеточной адгезии *CD34* (*CD34⁺⁺⁺CD45^{low/-}*), позволяет им взаимодействовать с плацентарной клеточной нишей. При изучении на клеточном уровне популяции *CD34⁺⁺⁺* гемопоэтических прогениторных клеток пуповинной крови человека было показано, что эти клетки имеют большой пролиферативный потенциал *in vitro* [4].

Таким образом, плацента содержит примитивные ГПК – потенциально стволовые клетки с фенотипом *CD34⁺⁺CD45^{low/-}*. Наши пред-

положения на основе полученных данных согласуются с работами, показывающими, что клетки с высоким уровнем *CD34* содержат примитивные ГПК, в том числе стволовые клетки. При этом примитивность прогениторных клеток тесно связана с уровнем *CD34* [5, 6, 7, 8, 10]. *Barcena et al.* нашли две популяции *CD34⁺⁺CD45^{low}* и *CD34⁺CD45^{low}* в ворсинках хориона и в хориоамниотической оболочке на разных стадиях развития плаценты. *CD34⁺⁺CD45^{low}* клетки экспрессируют маркеры мультипотентных примитивных ГПК и гемопоэтических стволовых клеток, демонстрируют миелоидный и эритроидный потенциал *in vitro*, образуют *CD56⁺* NK-клетки и *CD19⁺CD20⁺sIgM⁺* B-клетки в поликлональных жидких культурах, в то время как *CD34⁺CD45^{low}* содержат более коммитированные предшественники [3].

Клетки фетального костного мозга также содержат популяцию клеток с различным уровнем экспрессии *CD34* (*CD34^{hi}* и *CD34^{low}*), при этом только *CD34^{hi}* клетки имеют фенотип самых примитивных гемопоэтических клеток: *Thy-1⁺*, *HLA-DR^{low}*, *CD38^{low}*, *CD45RA⁻*, а также экспрессируют низкий уровень антигенов *CD13*, *CD33* и не имеют поверхностных антигенов более зрелых клеток (*CD2*, *CD10*, *CD14*, *CD15*, *CD16*, *CD19*, гликофорин). К тому же, клетки *CD34^{hi}* поддерживают длительный B-лимфопоз и миелопоэз *in vitro* и инициируют T-, B- и миелоидную репопуляцию тканей человека, имплантированных *SCID* мышам [6]. Во взрослом костном мозге экспрессия *CD34* уменьшается одновременно с созреванием клеток и увеличением экспрессии *CD38* маркера [10]. Было показано, что фетальная печень содержит клетки с высоким уровнем *CD34*, которые также несут *Thy-1⁺*, *CD117⁺*, *CD123⁺*, *HLA-DR⁺*, *CD7*, *CD38*, *CD45*, *CD71*, *CD115* и способны восстанавливать гемопоэз *in vivo* [7].

ВЫВОДЫ

Для ГПК, выделенных из ткани плаценты, свойственна фенотипическая гетерогенность в отличие от пуповинной крови и фетальной печени. Так, плацентарная ткань содержит три популяции клеток, которые отличаются по уровню экспрессии *CD34*: *CD34^{+/LOW}CD45^{LOW/-}*, *CD34⁺⁺CD45^{LOW/-}* и *CD34⁺⁺⁺CD45^{LOW/-}*. Подобно фетальной печени, плацента содержит популяции *CD34⁺⁺CD45^{LOW/-}* и *CD34⁺CD45^{LOW/-}* клеток, в связи с чем можно говорить о присутствии процесса кроветворения в плацентарной ткани. *CD34⁺⁺CD45^{LOW/-}* популяция также экспрессирует *CD133*, практически не несет линейные маркеры и имеет лимфоцитоподобную морфологию, что свидетельствует о наличии в такой популяции примитивных ГПК – потенциально стволовых клеток. Также среди плацентарных клеток присутствуют поздние прогениторы с фенотипом *CD34^{+/LOW}CD45⁺*, поскольку большинство этих клеток экспрессирует гемопоэтические линейные маркеры. Популяция с фенотипом *CD34⁺⁺⁺CD45^{LOW}* определяется только в плаценте и, возможно, образуется в плацентарной ткани или мигрирует из других регионов кроветворения и приобретает такой иммунофенотип под воздействием плацентарного микроокружения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лобинцева Г. С. Патент (11) 46673 А, Україна, Спосіб консервування гемопоетичних клітин людини. – Бюл. № 5 15.05.2002.
2. Шаблий В. А., Кучма М. Д., Кирик В. А. и др. Криоконсервирование ткани плаценты человека – источник гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. VII, №1. – С. 54-62.
3. *Barcena A., Muench M., Kapidzic M., Fisher S.* A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation // *Reprod. Sci.* - 2009. – **16**(2). – С. 178-187.
4. *By Li Lu, Mang Xiao, Rong-Nian Shen et al.* Enrichment, Characterization, and Responsiveness of Single Primitive CD34⁺⁺⁺ Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Progenitors With High Proliferative and Replating Potential // *Blood.* – 1993. – **81**, № 1. - С. 41-48.
5. *Craig W., Kay R., Cutler R. et al.* Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells // *Exp. Med.* – 1993. – **177**, № 5. – С. 1331-1342.
6. *DiGiusto D., Chen S., Combs J. et al.* Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34 // *Blood.* - 1994. – **84**, № 2. – С. 421-432.
7. *Marcus O. Muench, Roncarolo M., Namikawa R.* Phenotypic and Functional Evidence for the Expression of CD4 by Hematopoietic Stem Cells Isolated From Human Fetal Liver // *Blood.* – 1997. – **89**, № 4. – С. 1364-1375.
8. *Muench M., Cupp J., Polakoff J., Roncarolo M.* Expression of CD33, CD38 and HLA-DR on CD34⁺ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential // *Blood.* - 1994. – **83**, № 11 – С. 3170-3181.
9. *Serikov V., Hounshell C., Larkin S. et al.* Human Term Placenta as a Source of Hematopoietic Cells // *Experimental Biology and Medicine.* – 2009. – **234**. – С. 813-823.
10. *Terstappen L., Huang S., Safford M. et al.* Sequential generation of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34/CD380 progenitor cells // *Blood.* – 1991. – **77**, № 6. - С. 1218-1227.