

УДК 576-57.085.2:618.36+612.356

Кучма М. Д.<sup>1,2</sup>, Шаблій В. А.<sup>1,2</sup>, Кирик В. М.<sup>3</sup>, Онищенко А. Н.<sup>2</sup>, Шаблій Ю. Н.<sup>2</sup>, Лукаш Л. Л.<sup>1</sup>, Лобынцева Г. С.<sup>2</sup><sup>1</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна<sup>2</sup>Інститут клітинної терапії, Київ, Україна<sup>3</sup>ГУ «Інститут генетическої та 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<sup>+++</sup>CD45<sup>low</sup>*, *CD34<sup>++</sup>CD45<sup>low</sup>* и *CD34<sup>+/low</sup>CD45<sup>low</sup>*. Как и в фетальной печени, в плаценте содержатся популяции с фенотипом *CD34<sup>+++</sup>CD45<sup>low/-</sup>* и *CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low/-</sup>*, что позволяет говорить о кроветворении в плацентарной ткани. *CD34<sup>+++</sup>CD45<sup>low/-</sup>* 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<sup>+/low</sup>CD45<sup>+</sup>* и большинство их экспрессирует гемопоэтические линейные маркеры. Популяция с фенотипом *CD34<sup>+++</sup>CD45<sup>low</sup>* 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, 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 фильтрования 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 1,077 г/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

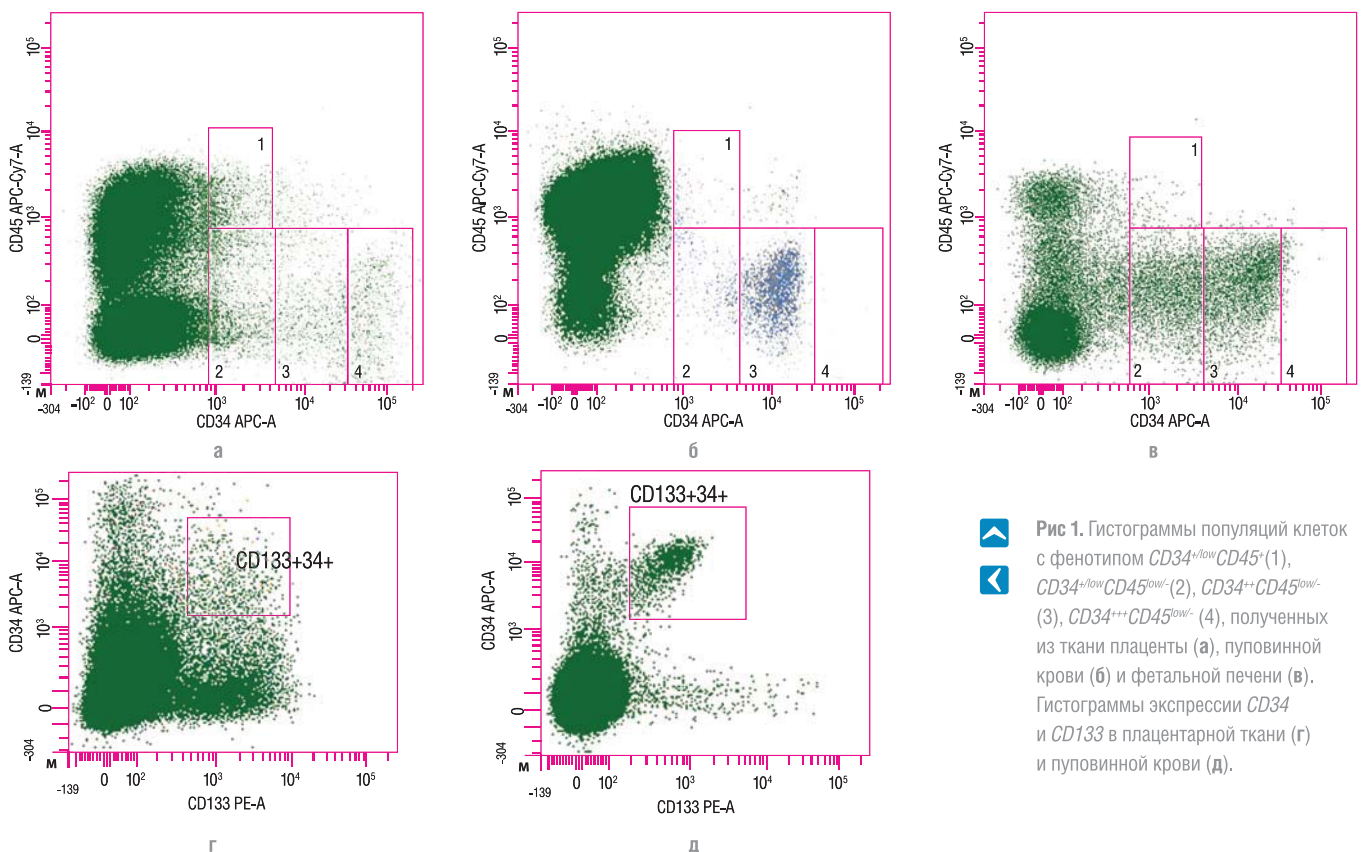
Для иммунофенотипирования плацентарных клеток, клеток кордовой крови и фетальной печени использовали следующие флуорохром-меченные моноклональные антитела (*Becton Dickinson*, США): *anti-CD34 APC*, *anti-CD90 FITC*, *anti-CD45 APC-Cy7*, *anti-CD105 PerCP-Cy 5.5*, *anti-CD73 PE*, *anti-CD14 Pacific Blue*, *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  $CD34^{high}CD45^{+}$  (1),  $CD34^{high}CD45^{low}$  (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).

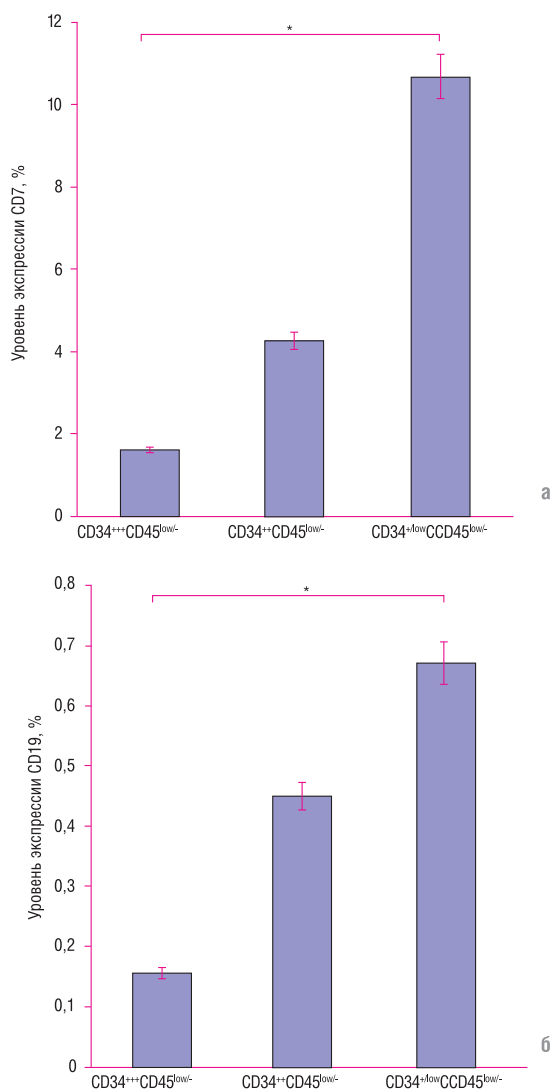


Рис. 2. Диаграммы уровней экспрессии  $CD7$  (а) и  $CD19$  (б) на разных популяциях ГПК:  $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ ,  $CD34^{++}CD45^{low/-}$ ,  $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ . \* -  $P < 0,05$ ,  $n=6$ .

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. FACS 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  $CD14$ ,  $CD19$ ,

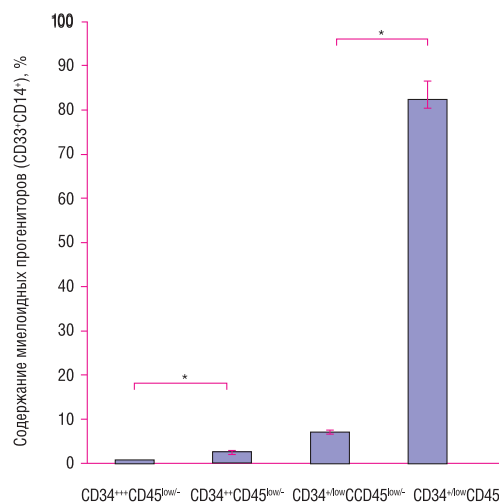


Рис. 3. Диаграмма содержания миелоидных прогениторов ( $CD33^+CD14^+$ ) среди разных популяций ГПК плацентарной ткани:  $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ ,  $CD34^{++}CD45^{low/-}$ ,  $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ ,  $CD34^{+/low}CD45^+$ . \* -  $P < 0,05$ ,  $n=6$ .



*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<sup>+</sup>CD45<sup>low/-</sup>* 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<sup>+++</sup>CD45<sup>low/-</sup>* клетки, которые так же, как *CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low/-</sup>*, не экспрессируют линейные маркеры, но в отличие от *CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low/-</sup>* 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<sup>+++</sup>CD45<sup>low/-</sup>*), позволяет им взаимодействовать с плацентарной клеточной нишей. При изучении на клеточном уровне популяции *CD34<sup>+++</sup>* 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<sup>+</sup>CD45<sup>low/-</sup>*. 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<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>* и *CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>* в ворсинках хориона и в хориоамниотической оболочке на разных стадиях развития плаценты. *CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>* клетки экспрессируют маркеры мультипотентных примитивных ГПК и гемопоэтических стволовых клеток, демонстрируют миелоидный и эритроидный потенциал *in vitro*, образуют *CD56<sup>+</sup> NK*-клетки и *CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>sIgM<sup>+</sup> B*-клетки в поликлональных жидких культурах, в то время как *CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>* содержат более коммитированные предшественники [3].

Клетки фетального костного мозга также содержат популяцию клеток с различным уровнем экспрессии *CD34* (*CD34<sup>hi</sup>* и *CD34<sup>low</sup>*), при этом только *CD34<sup>hi</sup>* клетки имеют фенотип самых примитивных гемопоэтических клеток: *Thy-1<sup>+</sup>*, *HLA-DR<sup>low</sup>*, *CD38<sup>low</sup>*, *CD45RA<sup>-</sup>*, 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<sup>hi</sup>* поддерживают длительный *B*-лимфопоэз 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<sup>+</sup>*, *CD117<sup>+</sup>*, *CD123<sup>+</sup>*, *HLA-DR<sup>+</sup>*, *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<sup>+/LOW</sup>CD45<sup>LOW/-</sup>*, *CD34<sup>++</sup>CD45<sup>LOW/-</sup>* и *CD34<sup>+++</sup>CD45<sup>LOW/-</sup>*. Подобно фетальной печени, плацента содержит популяции *CD34<sup>+</sup>CD45<sup>LOW/-</sup>* и *CD34<sup>+</sup>CD45<sup>LOW/-</sup>* клеток, в связи с чем можно говорить о присутствии процесса кроветворения в плацентарной ткани. *CD34<sup>+</sup>CD45<sup>LOW/-</sup>* 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<sup>+/LOW</sup>CD45<sup>+</sup>*, поскольку большинство этих клеток экспрессирует гемопоэтические линейные маркеры. Популяция с фенотипом *CD34<sup>+++</sup>CD45<sup>LOW</sup>* 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. Шаблій 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). – P. 178-187.
4. *By Li Lu, Mang Xiao, Rong-Nian Shen et al.* Enrichment, Characterization, and Responsiveness of Single Primitive CD34<sup>+++</sup> Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Progenitors With High Proliferative and Replating Potential // *Blood.* – 1993. – **81**, № 1. - P. 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. – P. 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. – P. 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. – P. 1364-1375.
8. *Muench M., Cupp J., Polakoff J., Roncarolo M.* Expression of CD33, CD38 and HLA-DR on CD34<sup>+</sup> human fetal liver progenitors with a high proliferative potential // *Blood.* - 1994. - **83**, № 11 – P. 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**. – P. 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. - P. 1218-1227.