

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ИЗ ТКАНИ ПЛАЦЕНТЫ ПОСЛЕ ЗАБОРА ОСНОВНОГО ОБЪЕМА ПУПОВИННОЙ КРОВИ

О.Г. Фурман, В.С. Костюнина, Е.В. Васина, Н.В. Петёвка

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий

Рядом ученых было показано, что плацентарная ткань содержит большое количество гемопоэтических кроветворных клеток [1, 6]. В соединительной ткани плаценты были обнаружены популяции CD34+ клеток не связанные с микроциркуляторным руслом [6]. Такие клетки имели свойства ранних кроветворных предшественников, а *in vitro* показали высокий пролиферативный потенциал в направлении лимфоидной и миелоидной дифференцировки [6].

Количество CD34+ клеток в ткани плаценты по разным данным варьирует от 2×10^6 , что примерно равно количеству этих клеток в объеме пуповинной крови, до $2,5 \times 10^7$ клеток на плаценту, что в 10 раз больше, чем в единице пуповинной крови [1–6]. Некоторые исследователи считают, что плацента сохраняет функции кроветворного органа на поздних сроках гестации [1].

Учитывая ограниченное количество стволовых кроветворных клеток в образце пуповинной крови, ткань плаценты может стать дополнительным источником их получения для аллогенных трансплантаций [1].

Цель работы — получение и характеристика гемопоэтических предшественников из ткани плаценты после забора основного объема пуповинной крови.

Материал и методы. Образцы плаценты и пуповинной крови были предоставлены ГУ РНПЦ «Мать и дитя» после информирования рожениц и получения их письменного согласия.

Оценка фенотипа гемопоэтических клеток плаценты и пуповинной крови производилась моноклональными антителами против CD45, CD34 и CD33 (все Beckman Coulter, Immunotech, Франция). Дифференцировочный потенциал предшественников исследовали методом колониеобразующего теста в полужидкой среде с цитокинами (MethoCult GF+ H4435, Stem Cell Technology, Канада) в соответствии с инструкцией производителя.

После основного забора пуповинной крови плаценту доставляли в лабораторию в контейнере со льдом в течении 60 мин после родов. Из плаценты вырезали котиледон 30–50 г и механически измельчали на фрагменты от 0,5 до 1,5 см в диаметре. Для выделения клеток использовали следующие методы: ферментативный,

механический и инкубация с ингибитором клеточной адгезии AMD3100 (ингибитор связывания ГСК с рецептором CXCR4). При ферментативной обработке использовали 0,12% трипсин-ЭДТА и 1 мг/мл коллагеназы I. Экспозиция с ферментами составляла 10–15 мин. Гомогенизацию проводили при комнатной температуре либо при 4°C путем мягкого перетирания ткани в стеклянном гомогенизаторе с последующей фильтрацией через нейлоновые фильтры с размером пор 60 мкм для избавления от клеточных агрегатов. Инкубация фрагментов ткани плаценты с AMD3100 проводилась при 37°C на шейкере в течении 90–120 мин.

Получение мононуклеарной фракции проводили путем разделения клеточной суспензии на градиенте плотности фиколла (1,077 г/л). Обогащенную CD34+ клетками фракцию мононуклеаров получали с помощью иммуномагнитной сепарации набором EasySep (StemCell Technologies, Канада) согласно инструкции производителя.

Результаты и их обсуждение. Ферментативная обработка тканей приводила к появлению большого количества дебриса, образованию клеточных агрегатов и, соответственно, низкого выхода жизнеспособных клеток. Более эффективным оказался способ получения клеток путем механического поэтапного измельчения плацентарной ткани. Исследовалось три варианта механической обработки, отличающиеся по температурным режимам (4°C и RT) и использованию ингибитора клеточной адгезии гемопоэтических стволовых клеток. По этим параметрам были выделены три метода:

1. Механическое измельчение ткани при 4°C.
2. Механическое измельчение ткани при комнатной температуре.
3. Механическое измельчение ткани при 4°C с последующей инкубацией в присутствии AMD3100.

Образование клеточных агрегатов удалось снизить за счет проведения всех операций при температуре 4°C и добавления в раствор ЭДТА в концентрации 1 mM. Количество полученных клеток из 50 г плацентарной ткани тремя методами составляло 24,9±21,5; 5,9±5,7 и 35,8±15,2 млн соответственно (рисунок 1). Не было выявлено статистически значимых отличий между 1 и 3 методами, однако, они наблюдались при сравнении методов 1 и 2 и метода 2 с методом 3 (непараметрический t-тест). Присутствие при инкубации фактора AMD 3100 снижало количество зрелых CD45+ клеток в суспензии, более чем в два раза, и увеличивало долю гемопоэтических предшественников миелоидного ряда с фенотипом CD45+CD33+.

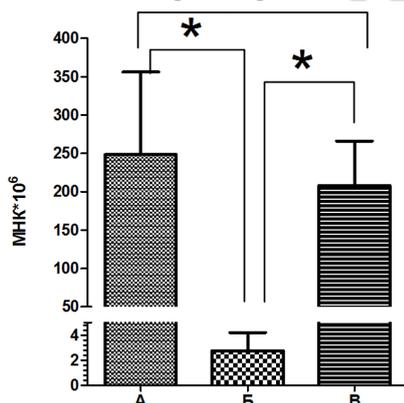


Рисунок 1 — Количество мононуклеарных клеток, полученных после механического измельчения ткани при 4°C (А) и комнатной температуре (Б), инкубации ткани с AMD3100 (В) (*p>0,05)

В результате проведенной серии экспериментов из фрагмента весом 50 г получали в среднем 92,5±57,6 млн ядросодержащих клеток (n=9).

Чтобы определить отличается ли иммунофенотип полученных из плаценты клеток от кроветворных клеток пуповинной крови, проводили параллельную иммуномагнитную сепарацию и иммуноокрашивание обогащенной CD34+ клетками мононуклеарной фракции плаценты и пуповинной крови одного и того же образца.

Анализ показал, что большинство CD34-положительных клеток плаценты не экспрессируют CD45 и CD33 в отличие от аналогичной популяции CD34-положительных клеток пуповинной крови (рисунки 2, 3). По экспрессии одного из эндотелиальных маркеров CD31 образцы не отличались (данные не представлены).

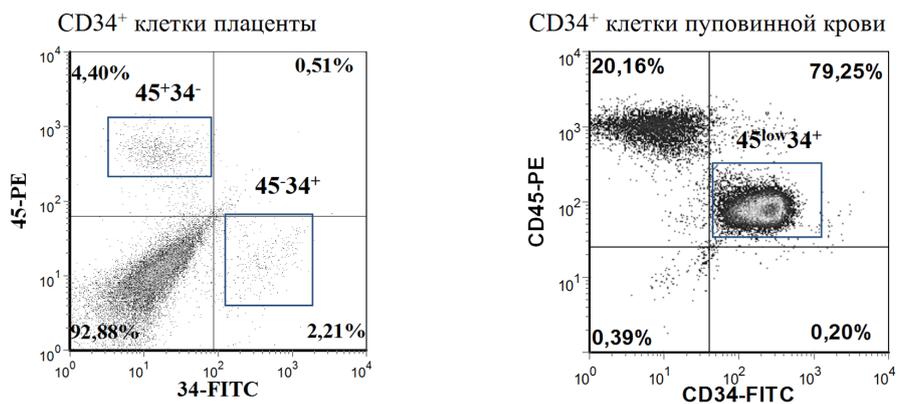


Рисунок 2 — Диаграмма рассеяния гемопоэтических клеток плаценты и пуповинной крови, экспрессирующих CD45 и CD34

Клетки плаценты с выявленными характеристиками могли относиться к популяции не гемопоэтического ряда. Для определения функциональных кроветворных свойств полученных популяций клеток исследовали их способность к колониобразованию в полужидкой среде.

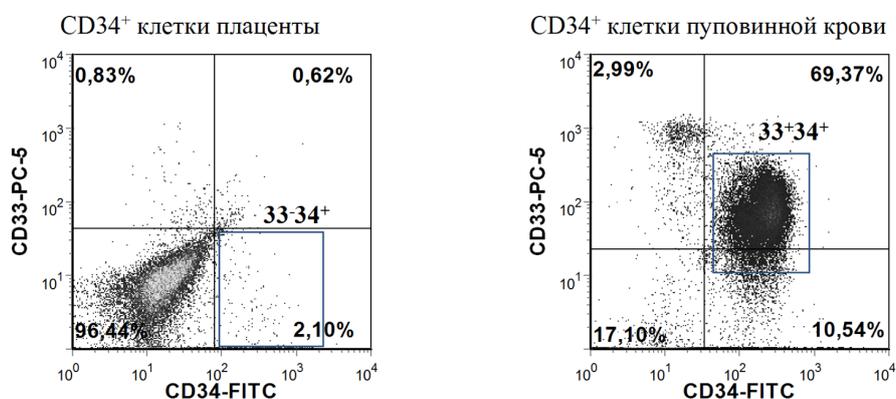


Рисунок 3 — Сравнительная диаграмма рассеивания образца гемопоэтических клеток плаценты и пуповинной крови, экспрессирующих CD34 и CD33

Колониобразующий тест в полужидкой среде на 14-е сут показал наличие эритроидных (КОЕ-Э), гранулоцитарных (КОЕ-Г), моноцитарных (КОЕ-М), гранулоцитарно-моноцитарных (КОЕ-ГМ) и олигопотентных (КОЕ-ГЭММ) колоний.

На 1000 CD34+ клеток, полученных после иммуномагнитной сепарации трех образцов плацентарной ткани, приходилось в среднем 247 ± 212 всех колониобразующих единиц. Для сравнения в аналогичных клетках пуповинной крови содержится в среднем $149,2 \pm 107$ колониобразующих единиц миелоидного ряда.

Достоверных отличий в распределении колоний по росткам кроветворения плацентарного происхождения и образцов пуповинной крови после сепарации не наблюдалось. CD34-положительные клетки плацентарной ткани в большинстве своем не несут маркеры CD45 и CD33 в отличие от CD34-положительных клеток пуповинной крови, но показывают аналогичную способность к образованию колоний миелоидного ряда в полужидкой среде. Показана возможность получения до 500 млн жизнеспособных ядросодержащих клеток и в среднем $1,5 \pm 1,3$ млн клеток с фенотипом CD34+ ($n=8$) из плаценты весом 500 г.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HEMATOPOIETIC PROGENITORS FROM PLACENTA UPON UMBILICAL CORD BLOOD COLLECTION

O.G. Furman, V.S. Kostyunina, E.V. Vasina, N.V. Petyovka

Objective: Isolation and characterization of hematopoietic progenitors from placental tissue.

CD34-positive cells from placental tissue do not generally express CD45 and CD33 surface markers in contrast to CD34-positive cells of umbilical cord blood. Nevertheless these cells possess similar capability to form myeloid

colonies in semisolid media. The possibility to isolate up to 500 mln of viable nucleated cells containing 1.5 ± 1.3 CD34-positive cells (n=8) was demonstrated with 500 g of placental tissue.

Литература

1. Human placenta and chorion: potential additional sources of hematopoietic stem cells for transplantation / A. Bárcena [et al.] // *Transfusion*. — 2011. — Vol. 51, № 4. — P. 94–105.
2. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells / C. Gekas [et al.] // *Dev Cell*. — 2005. — Vol. 8, № 3. — P. 365–375.
3. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells / O. Parolini [et al.] // *Stem Cells*. — 2008. — Vol. 26, № 2. — P. 300–311.
4. Dzierzak, E. Placenta as a source of hematopoietic stem cells / E. Dzierzak, C. Robin // *Trends Mol Med*. — 2010. — Vol. 16, № 8. — P. 361–367.
5. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development / C. Robin [et al.] // *Cell Stem Cell*. — 2009. — Vol. 5, № 4. — P. 385–395.
6. Human term placenta as a source of hematopoietic cells / V. Serikov [et al.] // *Exp. Biol. Med.* — 2009. — Vol. 234, № 7. — P. 813–823.
7. Криоконсервирование ткани плаценты человека как источника гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / В.А. Шаблий [и др.] // *КТТИ*. — 2012. — Т. VII, № 1. — С. 54–62.