

Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики

На правах рукопису

КУЧМА МАРІЯ ДМИТРІВНА

УДК576.5:576.53+612.119

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОПОЕТИЧНИХ
СЛОВБУРОВИХ/ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ,
ПУПОВИННОЇ КРОВІ ТА ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ**

03.00.20 – біотехнологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник
Лукаш Любов Леонідівна
д.б.н., професор

Київ – 2015

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	5
Вступ	7
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	14
1.1. Імунофенотип ГСПК плаценти людини	15
1.2. Імунофенотип ГСПК пуповинної крові людини	20
1.3. Імунофенотип ГСПК фетальної печінки людини.....	25
1.4. Функціональна активність ГСПК плацентарної тканини людини.....	28
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень	35
2.1. Виділення фракції моноклеарних клітин із тканини зрілої плаценти	35
2.2. Виділення фракції моноклеарних клітин із фетальної плаценти плодів людини першого триместру гестації.....	37
2.3. Виділення фракції моноклеарних клітин із пуповинної крові.....	37
2.4. Виділення фракції ядровмісних клітин з пуповинної крові	38
2.5. Отримання суспензії клітин фетальної печінки плодів людини першого триместру гестації.....	39
2.6. Отримання мобілізованої периферичної крові	39
2.7. Кріоконсервування тканини зрілої плаценти людини	39
2.8. Кріоконсервування пуповинної крові.....	40
2.9. Кріоконсервування фетальної печінки плодів людини першого триместру гестації.....	40
2.10. Виділення ГСПК із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти.....	41
2.11. Культивування фракції моноклеарних клітин нативної та кріоконсервованої плаценти в метилцелюлозо-вмісному та агаровмісному середовищах.....	41

2.12. Культивування фракції ядровмісних клітин пуповинної крові в метилцелюлозо-вмісному та агаровмісному середовищах	42
2.13. Культивування «мобілізованої» периферичної крові в метилцелюлозо-вмісному та агаровмісному середовищах	43
2.14. Фарбування гемопоетичних колоній азур-еозином.....	44
2.15. Проточна цитометрія.....	44
2.16. Імуноцитохімічне дослідження	45
2.17. FISH аналіз	46
2.18. Статистична обробка результатів	47

РОЗДІЛ 3. Порівняльна імунофенотипова характеристика гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки

48

3.1. Отримання гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин із тканини зрілої плаценти	48
3.2. Дослідження впливу ферментативної обробки на результати аналізу проточної цитофлуориметрії ГСПК	49
3.3. Підбір протоколу імунофенотипування ГСПК тканини плаценти	51
3.4. Порівняльний аналіз популяцій ГСПК плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки із різним рівнем експресії CD34 та CD45.....	56
3.5. Порівняльне дослідження експресії CD133, CD90 та CD31 в ГСПК плаценти та пуповинної крові	61
3.6. Порівняльний аналіз комітованих популяцій ГПК плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки	65
3.7. Спосіб виділення ГСПК із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти та їх характеристика.....	78

РОЗДІЛ 4. Диференціація гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин зрілої плаценти invitro порівнянні із пуповинною кров'ю

83

4.1. Мультипотентний потенціал invitro фетальних ГСПК зрілої плаценти у порівнянні із пуповинною кров'ю.....	83
--	----

4.1.1. Виявлення та характеристика плоских еритроїдних колоній у напівтвердих культуральних середовищах	88
РОЗДІЛ 5. Узагальнення і аналіз отриманих результатів.....	97
Висновки.....	104
Список використаних джерел.....	106

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

7-AAD – 7- аміноактиноміцин D

BFU-E – еритроїдні бурстоутворювальні одиниці

BSA – бичачий сировоточний альбумін

CD – кластер диференціювання

CD133 – глікопротеїн, маркер гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин

CD14 – мембранний глікозилінозитол-зв'язувальний білок, мієлоїдний маркер, що з'являється на моноцитах пізніх стадій дозрівання

CD19 – маркер В-лімфоїдних клітин

CD235 – глікофорин А, маркер зрілих еритроцитів та примітивних ембріональних еритроїдних клітин,

CD31 – молекула клітинної адгезії, маркер мультилінійних прогеніторів, ендотеліальних клітин, гемопоетичних клітин

CD33 – трансмембранний рецептор, маркер клітин ранньої стадії диференціювання в мієлоїдному напрямку

CD34 – мембранний білок, молекула міжклітинної адгезії, маркер стовбурових клітини людини,

CD45 – тирозинова білкова фосфатаза рецепторного типу, лейкоцитарний антиген, що експресується на всіх лейкоцитах,

CD45RA – маркер лімфоїдних та грануло-моноцитарних прогеніторних клітин

CD7 – мембранний білок із надродина імуноглобулінів, маркер Т-клітинної диференціації

CD90 – (Thy-1) тимоцитарний антиген, маркер стовбурових та прогеніторних клітин

CFU-E – еритроїдні колонієутворювальні одиниці

CFU-G – гранулоцитарні колонієутворювальні одиниці

CFU-GEMM – гранулоцитарні, еритроцитарні, моноцитарно/макрофагальні, мегакаріоцитарні колонієутворювальні одиниці

CFU-GM – гранулоцитарні та макрофагальні колонієутворювальні одиниці

CFU-M – моноцитарно/макрофагальні колонієутворювальні одиниці

CFU-Mix – змішані колонії (CFU-GEMM)

DNaseI – дезоксирибонуклеаза I

FACS – флуорисцентно-активованій клітинній сортинг

FISH – флуоресцентна гібридизація ДНК insitu

FSC – пряме світлорозсіювання

HEPES – 2-гідроксиетил-1-піперазинетансульфонова кислота

HLA – головний комплекс гістосумісності

HLA-DR – молекула головного комплексу гістосумісності II класу

HPP-CFC – колоніє утворюючі клітини, що мають високий проліферативний потенціал

ISHAGE – міжнародне об'єднання гематології та трансплантатної інженерії

LTC-IC – клітини, що ініціюють тривалу культуру

NK – натуральні кілери

PBS – фосфатно-сольовий буфер

SCID – імунodefіцитне генетичне захворювання

SSC – бічне світлорозсіювання

ГПК – гемопоетичні прогеніторні клітини

ГСПК – гемопоетичні стовбурові/прогеніторні клітини

DMEM – Дюльбеко модифіковане середовище Ігла

DMCO – диметилсульфоксид

ММСК – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини

ПЕК – плоска еритроїдна колонія

ФБС – фетальна бичача сироватка

ВСТУП

Актуальність теми. Значною проблемою гематології донині залишається дефіцит донорів гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин (ГСПК) для трансплантації при онкогематологічних захворюваннях і вроджених порушеннях кровотворення. Хоча трансплантація HLA-ідентичних (human leukocyte antigen) ГСПК кісткового мозку широко використовується для відновлення гемопоезу, їх нестача все ще обмежує широке впровадження клітинних технологій для лікування гематологічних захворювань. Також використовуються ГСПК, мобілізовані в периферичну кров із кісткового мозку після внутрішньовенного введення гранулоцитарного колоніє-стимулювального фактора [1]. Однак критичним є те, що термін від початку пошуку відповідного зразку ГСПК кісткового мозку або «мобілізованої» периферичної крові (тобто підбраного за антигенами гістосумісності) до моменту проведення трансплантації складає від 3 до 6 місяців, а процедура отримання трансплантату має ускладнення для донорів [2]. Починаючи із 1988 року, у клінічній практиці почали використовувати пуповинну кров як джерело ГСПК, і на сьогодні вона широко застосовується у світі для лікування вроджених та злоякісних захворювань кровотворення [3]. Перевагами пуповинної крові як джерела ГСПК є легкість і безпечність її отримання; доступність для негайного використання зразків кріоконсервованих клітин, типованих за HLA; можливість використання зразків сумісних лише за 3 чи 4 генами HLA; порівняно низька вірогідність розвитку гострої або хронічної реакції «трансплантат проти хазяїна». Однак існують і недоліки, які включають недостатню кількість зібраних клітин, більш тривалий час відновлення нормального рівня нейтрофілів, тромбоцитів і лімфоцитів у реципієнтів після трансплантації та меншу вірогідність приживлення трансплантата [2, 3]. Фетальна печінка людини є багатим джерелом ГСПК [4, 5]. Трансплантації клітин фетальної печінки *in utero* та постнатально дають багатообіцяючі результати при лікуванні імунодефіцитних захворювань, вроджених

порушень метаболізму та апластичної анемії [6, 7]. Однак фетальна печінка містить відносно незначний об'єм клітин, отримання яких не є простою процедурою. Крім того, застосування ГСПК фетальної печінки є проблемним із етичних міркувань [5].

Таким чином, пошук нових додаткових джерел ГСПК є важливим для медицини. Дослідження останніх років показали, що плацента людини відіграє важливу роль у фетальному гемопоезі [8, 9], і вважається, що вона може бути потенційним додатковим джерелом ГСПК для трансплантацій [10]. Однак імунофенотип плацентарних ГСПК і їхня мультипотентність все ще недостатньо вивчені. Для оцінки можливості застосування ГСПК із зрілої плаценти для клінічних цілей необхідно дослідити їхні характеристики. При цьому важливо порівняти їхній імунофенотип та потенціал до диференціювання із відповідними клітинами інших кровотворних тканин плода та циркулюючими ГСПК пуповинної крові, оскільки вони вже застосовуються для лікування захворювань кровотворення. Також необхідно розробити ефективні методи виділення та зберігання таких клітин для подальшого використання.

Отже, безперечно актуальними завданнями є дослідження імунофенотипових характеристик та потенціалу до диференціації *in vitro* ГСПК із плаценти у порівнянні із відповідними клітинами пуповинної крові та фетальної печінки, а також розробка методів виділення та тривалого зберігання функціонально активних ГСПК.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетних наукових тем відділу генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України «Особливості експресії гена репаративного ензиму O⁶-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази в умовно нормальних та пухлинних клітинах» (номер державної реєстрації 0108U008526, 2009-2013 рр.) та «Регуляція експресії гена репаративного ензиму MGMT під впливом деяких біологічно активних речовин (гормонів, цитокінів, лектинів та ін.) у клітинах ссавців» (номер державної реєстрації 0115U000355, 2014-2018 рр.) та частково у рамках наукового проекту, одержаного на конкурсній основі: «Альтернативні моделі для тестування клітинних препаратів на онкогенність»

(номер державної реєстрації 0114U003877, 2014-2015 рр.), який фінансується відділенням цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при Національній академії наук України.

Мета і завдання досліджень. Основною метою роботи було модифікувати методи виділення ГСПК із нативної плаценти та розробити спосіб їх виділення із кріоконсервованої плаценти, провести порівняльне дослідження імунофенотипу кровотворних клітин плаценти, пуповинної крові й фетальної печінки людини та їхнього потенціалу до диференціювання *in vitro*. Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати такі завдання:

1. Модифікувати методи виділення ГСПК із тканини плаценти.
2. Розробити спосіб виділення ГСПК із кріоконсервованої плацентарної тканини.
3. Порівняти морфологію клітин та експресію основних поверхневих маркерів (CD34, CD45, CD133, CD90, CD31) для ГСПК плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки.
4. Провести кількісний аналіз мієлоїдних, еритроїдних та лімфоїдних клітин-попередників в тканині плаценти, пуповинній крові та фетальній печінці.
5. Порівняти потенціал до диференціації в умовах *in vitro* ГСПК плаценти та пуповинної крові.
6. Дослідити морфологію і клітинний склад плоских еритроїдних колоній (ПЕК), що вперше виявлені в культурі гемопоетичних клітин.

Об'єкт дослідження: особливості ГСПК плацентарної тканини порівняно з відповідними клітинами інших джерел (пуповинна кров, фетальна печінка), що свідчать про наявність процесів мієло-, еритро- та лімфопоезу в плаценті людини.

Предмет дослідження: імунофенотип ГСПК плацентарної тканини, пуповинної крові та фетальної печінки людини і мультипотентний потенціал до диференціювання в умовах *in vitro*.

Методи досліджень. Для вирішення поставлених завдань був використаний наступний перелік методів: виділення клітин із тканини зрілої плаценти та плаценти плодів людини першого триместру гестації, пуповинної крові та фетальної печінки; кріоконсервування гемопоетичних тканин; культивування клітин, що були виділені із плаценти, пуповинної та «мобілізованої» периферичної крові у напівтвердих культуральних середовищах; проточна цитофлюориметрія; імуноцитохімічне дослідження, FISH аналіз та статистична обробка даних.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі нами вперше одержано результати порівняльного аналізу ГСПК плаценти з відповідними клітинами інших гемопоетичних тканин, таких як пуповинна кров та фетальна печінка.

У роботі модифіковано методи виділення ГСПК плацентарної тканини, а саме зменшено кількість ферментів та застосовано їх менші концентрації у порівнянні із відомими запропонованими способами отримання таких клітин.

Вперше застосовано одноплатформений протокол ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) для аналізу вмісту ГСПК у плацентарній тканині методом проточної цитофлюориметрії, який є загальноприйнятим для оцінки ГСПК інших джерел, таких як пуповинна кров та кістковий мозок.

Результати досліджень вперше продемонстрували, що для ГСПК зрілої плаценти та плаценти першого триместру гестації властива більша фенотипова гетерогенність порівняно з відповідними клітинами пуповинної крові та фетальної печінки. Так, в плацентарній тканині нами виділено п'ять популяцій клітин за інтенсивністю експресії CD34 та CD45, а саме: $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+/low}CD45^{+}$, $CD34^{++}CD45^{+}$, при цьому у фетальній печінці міститься три з них ($CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+++}CD45^{low/-}$), а у пуповинній крові – лише дві ($CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$).

Новими даними є результати порівняння експресії CD90 на ГСПК із плацентарної тканини та пуповинної крові, які показують, що для ГСПК плаценти характерний достовірно вищий рівень експресії цього маркера. Крім того, нами вперше ідентифіковано, що ГСПК плацентарної тканини містять дві субпопуляції

клітин із різною інтенсивністю експресії CD31, а саме CD34⁺CD45^{low}CD31^{hi} та CD34⁺CD45^{low}CD31^{low}, тоді як в пуповинній крові присутня лише одна популяція: CD34⁺CD45^{low}CD31^{low} клітини. Показано, що експресія CD133 маркеру на ГСПК в обох тканинах не відрізняється.

Плацентарна тканина, як і інші джерела (пуповинна кров, фетальна печінка) містить мієлоїдні, еритроїдні, мієло-еритроїдні, Т/НК- та В- лімфоїдні прогенітори, що може свідчити про проходження саме в цій тканині процесів мієло- еритро- та лімфопоезу. Вагомими та раніше не встановленими даними є відмінності між складом популяцій ГСПК плацентарної тканини та пуповинної крові. Так, кількість комітованих клітин серед плацентарних ГСПК достовірно вища, ніж серед відповідних клітин пуповинної крові. В плацентарній тканині, як і в фетальній печінці, наряду із ранніми виявляються пізні мієлоїдні прогенітори.

Показано, що в умовах *in vitro* мультипотентний потенціал ГСПК плацентарної тканини та пуповинної крові суттєво не відрізняється, на що вказують однакові співвідношення різних типів колоній, утворених ГСПК обох джерел.

Вперше показано здатність ГСПК до утворення плоских еритроїдних колоній, які складають ранні еритроїдні прогенітори, при культивуванні фракції моноклеарних клітин плацентарної тканини, клітин пуповинної та мобілізованої периферичної крові в напівтвердих середовищах. В роботі наводиться детальна характеристика ПЕК, які раніше не були описані.

Практичне значення отриманих результатів. Результати наших досліджень обґрунтовують перспективність ГСПК плацентарної тканини для проведення трансплантацій з лікувальними цілями. Отримані дані дозволяють припустити, що використання ГСПК пуповинної крові разом із ГСПК зрілої плацентарної тканини для трансплантацій можуть усунути деякі недоліки пуповинної крові, як джерела ГСПК. Оскільки, як нами встановлено, плацентарні ГСПК мають більш високий вміст мієлоїдно-комітованих клітин на відміну від пуповинної крові, ко-трансплантація ГСПК пуповинної крові та плаценти, на нашу думку, допоможе подолати таку проблему, як затримка відновлення нормального рівня нейтрофілів і тромбоцитів в крові реципієнта. До того ж, такий підхід може дозволити збільшити

кількість трансплантованих ГСПК, нестача яких є дуже серйозною проблемою при клітинних трансплантаціях. Отримані дані дозволяють зробити наступний крок у вивченні властивостей ГСПК плацентарної тканини як перспективного клітинного трансплантату – проведення доклінічних досліджень ефективності трансплантації цих клітин при лікуванні гематологічних патологій. Підібраний спосіб кріоконсервування тканини плаценти як джерела ГСПК дозволяє зберегти такі клітини з метою їх подальшого використання. Слід зазначити, що даний спосіб кріоконсервування тканини був розроблений нами раніше для збереження ММСК та пропонувався для створення низькотемпературного донорського та/або аутологічного банку плацентарної тканини із забезпеченням скринінгу донорів та тканин плаценти на присутність трансмісивних інфекцій, наявність контамінацій бактеріями та грибами і відсутність вроджених та набутих патологічних процесів [11, 12, 13, 14]. Можливість отримання ГСПК із кріоконсервованої тканини плаценти є передумовою для розробки технології збереження та виділення ГСПК із кріоконсервованої плаценти відповідно до стандартів GMP та створення низькотемпературних банків плаценти для подальшого впровадження в лікувальну практику. Так, у випадку збереження плаценти як аутологічного матеріалу такий методичний підхід дозволить охопити більшу низку патологій, для яких тканина може бути застосована у випадку захворювань. Можливість отримувати різні типи клітин із збереженої тканини плаценти може мати важливе значення для регенеративної медицини.

Особистий внесок здобувача. Наведені в дисертаційній роботі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі. Роботу виконано під керівництвом завідувача відділу генетики людини ІМБГ НАН України д.б.н., проф. Лукаш Л.Л. Дана тема та концепція досліджень розроблялись спільно з «Інститутом клітинної терапії» в особі директора Банку пуповинної крові та інших тканин і клітин людини к.б.н., с.н.с. Лобинцевої Г.С. та заступника директора к.б.н. Шаблія В.А. Дослідження імунофенотипу ГСПК методом проточної цитофлюориметрії проведено спільно із завідувачем лабораторії клітинних та тканинних культур ДУ «Інститут генетичної і регенеративної медицини НАМН» к.мед.н. Кириком В.М.

Апробація результатів дисертації. Матеріали досліджень, викладені в даній науковій праці, були представлені на 3-му Світовому конгресі «World Cord Blood Congress 2011» (Рим, Італія, 2011), 10-му щорічному з'їзді «International Society for Stem Cell Research», (Йокогама, Японія, 2012), 3-му Українському конгресі із клітинної біології (Ялта, Україна, 2012), Науковій конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми кріобіології і кріомедицини» (Харків, Україна, 2012), Міжнародній школі-конференції "Тиждень клітинних технологій" (Київ, Україна, 2013), 7-мій Конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, присвяченій 175-ій річниці з дня народження О.Я. Данілевського (Київ, Україна, 2013), 8-мій Конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвяченій 90-ій річниці з дня народження П.Г. Костюка (Київ, Україна, 2014), 3-ій Конференції міжнародної асоціації стовбурових клітин плаценти «На шляху до клінічного використання стовбурових клітин плаценти та ендометрію» (Гранада, Іспанія, 2014), 13-му щорічному з'їзді «International Society for Stem Cell Research», (Стокгольм, Швеція, 2015), Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології» (Львів, Україна, 2015).

Публікації. Основні результати досліджень опубліковано в 18 наукових працях, серед яких 7 наукових статей у фахових виданнях, 1 патент на корисну модель, 10 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із вступу і 5 розділів, серед яких огляд літератури, матеріали і методи досліджень, два розділи власних досліджень, розділ, присвячений узагальненню і аналізу отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 164 джерела. Дисертацію викладено на 129 сторінках машинописного тексту (комп'ютерний друк). Роботу ілюстровано 26 рисунками та 2 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Всі клітини крові походять від одного попередника – стовбурової кровотворної клітини. На рис. 1.1. представлено шляхи диференціювання гемопоетичних клітин.

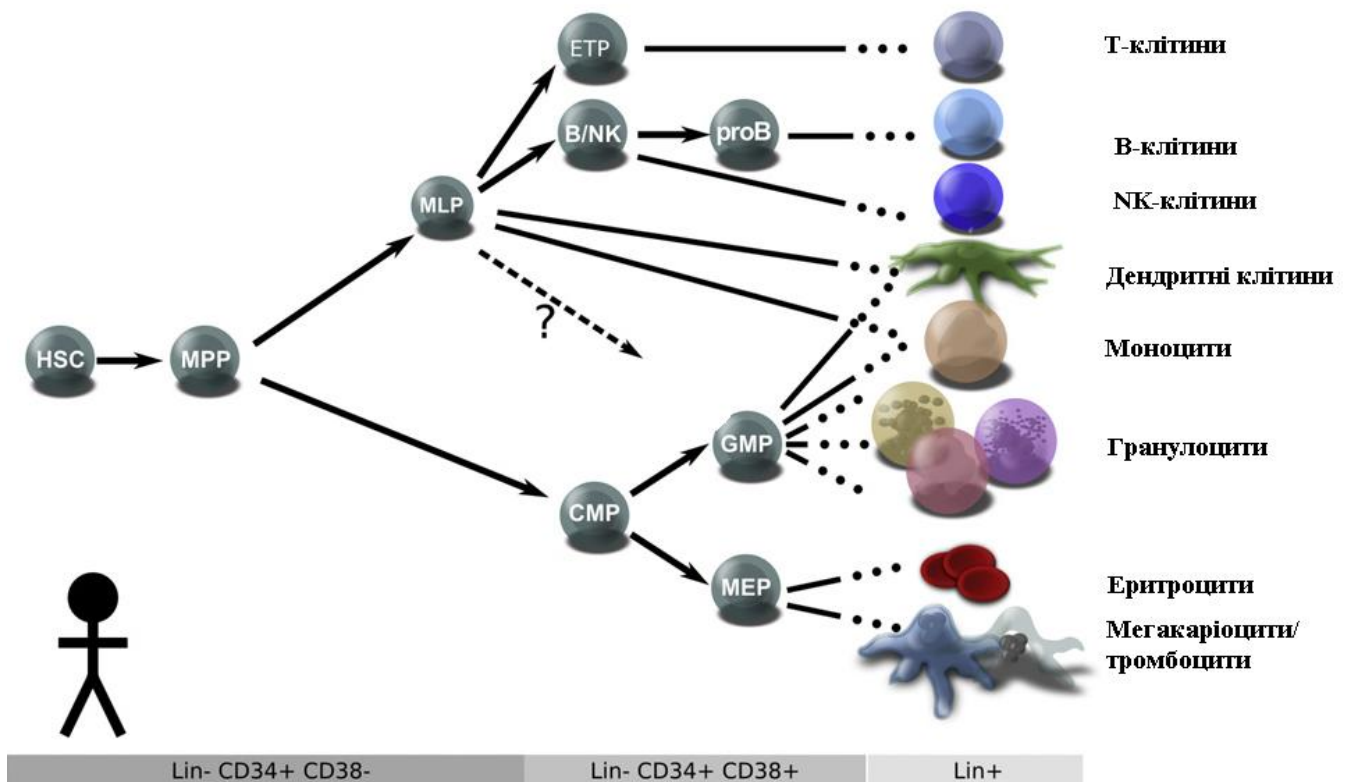


Рис. 1.1. Схема диференціювання клітин кровотворної системи людини, адаптовано з [15]. HSC – гемопоетичні стовбурові клітини, MPP – мультипотентні клітини попередники, MLP – загальні попередники лімфоцитів, CMP – загальні попередники міелоцитів, ETP – найбільш ранні прогенітори Т-клітин, B/NK – прогенітори В та NK клітин, GMP – гранулоцитарно-макрофагальні попередники, MEP – мегакаріоцитарно-еритроїдні попередники, Lin^+ - Т клітини, В-клітини, NK-клітини, дендритні клітини, моноцити, гранулоцити, еритроцити, мегакаріоцити, тромбоцити

Перші відомості в літературі про наявність ГСПК в плацентарній тканині людини з'явилися у 2005 році [16]. На сьогоднішній день опубліковано одиничні роботи, присвячені вивченню плацентарного гемопоезу людини, які, головним чином, зосереджені на гемопоезі в плаценті ранніх термінів гестації [17, 18]. Починаючи з 2009 року, в роботах, присвячених переважно фетальному плацентарному гемопоезу людини згадується про наявність ГСПК в зрілій плаценті та описуються деякі особливості таких клітин [9, 10]. Проте, саме ГСПК зрілої плаценти можуть стати перспективним матеріалом для клінічного використання. На відміну від плацентарних, ГСПК пуповинної крові, яка вже більше 25 років застосовується в клінічній практиці для трансплантацій, є досить добре вивченими. Також проведено цілу низку досліджень із вивчення ГСПК фетальної печінки.

1.1. Імунофенотип ГСПК плаценти людини

В роботах із досліджень імунофенотипу плацентарних ГСПК людини відповідні клітинні суспензії, отримані ферментативним шляхом, аналізують переважно методом проточної цитофлюориметрії [9, 17, 18]. До плацентарних ГСПК відносять такі клітини, що мають стандартний фенотип $CD34^+CD45^{low}$. $CD34$ – загальновизнаний маркер кровотворних стовбурових клітини людини [19]. $CD45$ (загальний лейкоцитарний антиген) – маркер, що експресується на усіх лейкоцитах [20]. До того ж, серед плацентарних клітин виділяють дві субпопуляції $CD34^+CD45^{low}$ (2,86 – 20,91 %) та $CD34^{++}CD45^{low}$ (0,03 – 1,2 %), які присутні на різних етапах гестації [17]. Клітини $CD34^+CD45^+$ локалізуються біля плацентарних судин всіх розмірів та в мезенхімальних компартментах хоріональних ворсинок в тісному контакті із ендотеліальними та мезенхімальними клітинами на ранніх термінах гестації [17, 18]. В зрілій плаценті $CD34^+CD45^+$ клітини переважно зосереджені у ворсинчастій стромі і часто асоційовані із ендотеліальними клітинами [10]. Зріла плацентарна тканина містить субпопуляцію $CD34^{++}CD45^{low}$ в кількості 0,1 – 0,3 % [17]. Показано, що виділені плацентарні $CD34^+CD45^{low}$ клітини мають фетальне походження [17].

На сьогоднішній день розповсюдженим є твердження, що гемопоетичні прогенітори знаходяться в популяції $CD34^{++}CD38^{-}$ клітин, які відносять до примітивних, мультипотентних. Така популяція багата на LTC-IC (клітини, що ініціюють тривалу культуру) та HPP-CFC (колонієутворювальні клітини, що мають високий проліферативний потенціал). $CD34^{++}CD38^{-}$ клітини містяться також в кістковому мозку [21, 22], фетальній печінці [23] та пуповинній крові [24]. Саме ця популяція клітин забезпечує відновлення кісткового мозку імунодефіцитних мишей NOD/SCID, тоді як $CD34^{++}CD38^{+}$ популяція має більш обмежений потенціал диференціювання [25]. Плацентарні гемопоетичні прогеніторні клітини першого та другого триместру гестації характеризуються відсутністю експресії CD38 на відміну від більшості прогеніторів фетальних тканин та тканин дорослого організму [21, 22, 23]. CD38 детектується на рівні 25 % від усіх $CD45^{+}$ клітин плаценти другого триместру гестації [8]. Зріла плацентарна тканина містить гемопоетичні прогенітори із фенотипом $CD34^{+}CD38^{+}$ та $CD34^{+}CD38^{-}$ серед клітин, що вимиваються із судин, а також в суспензії клітин, одержаних після обробки колагеназою, як плацентарних судин, так і цілісної тканини плаценти. Вміст $CD34^{+}CD38^{-}$ клітин серед фракції моноклеарних клітин після обробки колагеназою тканини плаценти у 6 – 10 разів вищий порівняно із кров'ю, взятою із пуповини та судин плаценти. До того ж, в суспензії клітин, одержаних після обробки судин та тканини плаценти колагеназою, міститься субпопуляція $CD34^{++}CD38^{-}CD31^{+}$ клітин, які не несуть CD45, що відповідає імунофенотипу ендотеліальних клітин [18]. Фракція $CD34^{-}$ клітин плаценти також може містити деяку кількість незрілих гемопоетичних прогеніторів, навіть більш примітивних, ніж $CD34^{++}CD38^{-}$ клітини. Слід відзначити, що $CD34^{lin^{-}}$ популяція клітин кісткового мозку характеризується здатністю до міграції при дослідженні на ксенографтній моделі вівці «human/sheep» [26].

Методом флюоресцентної імуногістохімії на парафінових зрізах було показано, що в тканині зрілої плаценти містяться $CD34^{+}$ клітини, що експресують CD133, CD90 та CD38. Одним із маркерів, що в більшості робіт використовують для характеристики ГСПК різних джерел, є CD133 – маркер гемопоетичних стовбурових та прогеніторних клітин [27, 28], який експресується клітинами пуповинної крові

високо збагаченими на LTC-IC [29]. Клітини, що були позитивні за CD34 та CD133, не експресували CD31 та KDR (рецептор вазо-ендотеліального фактору росту 2 типу) [9]. Також багато авторів вивчали експресію на ГСПК маркера стовбурових клітин CD90, і було показано, що цей маркер експресується на клітинах пуповинної крові [30, 31], що мають найбільший проліферативний потенціал *in vitro* [30]. Також було встановлено, що популяція клітин з фенотипом CD34⁺CD90⁺Lin⁻ збагачена значною мірою мультипотентними клітинами, які утворюють як В-лімфоцити, так і мієлоїдні клітини [32], і мають більшу здатність до колоніє-утворення, ніж CD34⁺CD90⁻Lin⁻ клітини [33]. Сортуння субпопуляції CD34⁺CD90⁺ клітин кісткового мозку призводить до збагачення на клітини, які здатні підтримувати довготривалі культури та мають високий проліферативний колоніє-утворювальний потенціал [33]. Типовий фенотип гемопоетичних клітин включає також експресію CD31 [34]. Цей маркер експресується на мембрані мультилінійних прогеніторів, мієлоїдних та В-лімфоїдних попередниках кісткового мозку [35]. HLA-DR експресується макрофагами, В-, активованими Т- та дендритними клітинами [36, 37]. На першому та другому триместрі плацентарні клітини з фенотипом CD34⁺⁺CD45^{low} характеризуються експресією CD133, CD90, HLA-DR, низьким рівнем CD117, CD33 та високим рівнем CD31, відсутністю CD41 (маркер тромбоцитів, мегакаріоцитів та ранніх ембріональних гемопоетичних клітин) та CD95 (маркер моноцитів, нейтрофілів, активованих лімфоцитів та фібробластів) [17].

Про проходження кровотворення в плаценті свідчить наявність комітованих гемопоетичних прогеніторів, спрямованих у різні лінії диференціювання. Як відомо, CD33 – один з маркерів, що характерний для клітин ранньої стадії диференціювання в мієлоїдному напрямку [9, 10]. Також CD33 може експресуватись на лімфоїдних клітинах [38]. Так, ранні попередники фетальних тимоцитів та постнатальні CD34⁺ тимоцити несуть маркер CD33 [39]. CD14 вважається мієлоїдним маркером, він з'являється на моноцитах більш пізніх стадій дозрівання та експресується на базофілах і нейтрофілах [40, 41]. CD14 також експресується на початкових та проміжних етапах диференціювання дендритних клітин [42]. CD34⁺CD14⁺CD1a⁻

клітини пуповинної крові можуть диференціюватись в моноцити або в дендритні клітини в залежності від дії різних ростових факторів [43]. До того ж, є дані, що $CD14^+$ клітини пуповинної крові можуть бути попередниками NK клітин. Так, клітини з фенотиповими характеристиками мієлоїдних клітин, що несуть $CD14$, $CD11b$, $CD11c$, $CD13$ та $CD33$, можуть диференціюватись в NK клітини при культивуванні з такими факторами росту, як $flt3$, SCF разом із інтерлейкіном 15 [44]. Як відомо, $CD7$ вважається найбільш раннім класичним маркером Т-клітинної диференціації, детектується на прогеніторах Т-клітин жовточного мішку, фетальної печінки та кісткового мозку людини [45, 46]. Експресія $CD7$ характерна не лише для прогеніторів Т-клітин, але і для попередників В- та мієлоїдних клітин дорослого кісткового мозку та фетальної печінки [46], однак популяція $CD34^+CD7^+$ клітин містить лише мінорну субпопуляцію клітин, комітованих в мієлоїдному напрямку, що підтверджує CFU тест та здатність до продукування гранулоцитів в довго підтримувальних культурах [47]. $CD34^+CD7^+$ популяція клітин багата на клітини, що знаходяться на проміжному етапі диференціювання в NK клітини [48]. В іншій роботі також показано, що такий імунотип властивий раннім попередникам NK клітин [49]. В кістковому мозку на 18 – 23 тижні гестації містяться клітини з імунотипом $CD34^+CD7^+CD19^+$, які можуть бути попередниками всіх лімфоїдних клітин та/або лише В-лімфоцитів [50].

Мультипараметрична проточна цитометрія зразків після фарбування із антитілами до $CD34$ та лінійно-специфічних маркерів використовується для ідентифікації прогеніторів, комітованих в мієлоїдному, еритроїдному, Т- та В-лімфоїдних напрямках [49, 51–56]. В плацентарній тканині на другому триместрі гестації присутні клітини з експресією $CD13$, $CD33$, $CD14$, $CD44$, що свідчить про їхню належність до мієлоїдної лінії [17]. Експресія лінійних маркерів спостерігається на клітинах $CD34^+CD45^{low}$ популяції, однак маркер $CD33$ на низькому рівні детектується у $CD34^{++}CD45^{low}$ клітинах. Серед клітин, що експресують $CD13$, є як гемопоетичні мієлоїдні попередники, оскільки вони позитивні за $CD33$, $CD14$ та $CD45$, так і негемопоетичні, які не експресують $CD45$. Клітини, що позитивні за маркером $CD14$, є клітинами Хофбауера, вони також

експресують VEGF-R2 (KDR) і Tie2 (маркер ендотеліальних клітин та моноцитів) на високому рівні та CD86 (маркер моноцитів та макрофагів, активованих В-лімфоцитів) на низькому рівні. При цьому одна третина експресує CD15 (маркер моноцитів). Більшість клітин Хофбауера експресує низку маркерів, що властиві макрофагам та дендритним клітинам: CD80, CD83, DS-SIGN, CD11a, CD11b, CD1c та HLA-DR на рівні від середнього до високого. [8]. В одній із найбільш ранніх робіт із плацентарного гемопоезу вперше було показано, що еритробласти локалізуються поза судинами плаценти на 6 та 12 – 14 тижнях гестації в стромі ворсинки. Такі клітини позитивні за CD235-A та Ki-67 (маркер проліферативності). Раннє кровотворення в ворсинках хоріона підтверджується також наявністю таких маркерів примітивного та дефінітивного гемопоезу, як GATA-2 та C-kit [16]. CD117 протягом нормального гемопоезу може експресуватись на самих ранніх стадіях диференціювання Т- та В- клітин. В подальшому експресія цього маркера зберігається лише при дозріванні мієлоїдних ростків кровотворення, але рівень його експресії плавно знижується [57]. Однак інші дані вказують на те, що за рівнем експресії CD117 можна розділити мієлоїдні та лімфоїдні клітини-попередники [58]. В плацентарній тканині на другому триместрі гестації присутні клітини, що експресують CD71, EpoR та CD235, які властиві еритроїдним клітинам на різних стадіях диференціювання. Як відомо, CD235 (глікофорин А) експресується на зрілих еритроцитах [59] та на примітивних ембріональних еритроїдних клітинах [60]. Інші автори спостерігали еритроїдні клітини на 5 тижні гестації в стромі плацентарних ворсинок. Слід відзначити, що між 5 та 7 тижнем гестації детектуються екстраваскулярні примітивні еритробласти, які експресують ξ - гемоглобін (характерний для примітивних еритроцитів), CD71 та CD235. В енуклеації цих клітин беруть участь резидентні макрофаги, які в свою чергу розвиваються зі спеціалізованих прогеніторних клітин, що експресують CD34, CD43, FXIII та CD68 [61]. В зрілій плаценті у міжворсинчатому просторі виявляються фетальні лейкоцити, що позитивні на CD15 та CD45 [16].

На 22 тижні гестації в плацентарній тканині серед CD45⁺ клітин не виявляли CD3⁺ Т-лімфоцитів, однак детектували незначну кількість NK⁺ клітин. Слід

відзначити, що Т-клітини не спостерігаються, починаючи з 12,5 тижнів гестації до 39,5 тижнів, а вміст NK⁺ клітин коливається в межах від 0,05 до 3,5% протягом 10 – 39,5 тижнів гестації [8]. Ізольовані плацентарні CD34⁺⁺CD45^{low} клітини не експресують лімфоїдні маркери такі, як CD19, CD20, sIgM та CD56, однак автори не наводять терміну гестації аналізованої тканини [10].

Таким чином, ГСПК плацентарної тканини першого та другого триместру гестації експресують основні маркери прогеніторних та стовбурових клітин. Серед ГСПК також присутні комітовані клітини переважно у мієлоїдному та еритроїдному напрямку. Для ГСПК зрілої плаценти досліджено лише експресію CD34, CD45 та CD38 маркерів методом проточної цитометрії, а також CD90, CD133 та CD15 – методом імуногістохімії. Однак жодних відомостей щодо морфології ГСПК зрілої та фетальної плаценти, що детектується методом проточної цитометрії, не наведено, а саме даних в координатах прямого та бічного світлорозсіювання (FSC/SSC), які визначають розмір та гранулярність клітин та слугують важливим параметром для характеристики ГСПК. Також були відсутні відомості щодо наявності комітованих ГПК у зрілій плаценті.

1.2. Імунофенотип ГСПК пуповинної крові людини

Основними маркерами, за якими прийнято ідентифікувати ГСПК пуповинної крові, є CD34 та CD45 [62, 63]. Врахування експресії панлейкоцитарного маркера CD45 є найбільш коректним способом виділення лейкоцитів при імунофенотипуванні ГСПК пуповинної крові. Обов'язковою умовою правильності ідентифікації ГСПК є гейтування за морфологією, при цьому події, які розташовані поза зоною лімфоцитоподібних клітин на гістограмі FSC/SSC не можуть бути враховані як істинні ГСПК. При цьому в популяції CD34⁺ клітин може бути виявлена гетерогенність за експресією CD34, а саме наявність двох субпопуляцій CD34^{bright} та CD34^{dim} [19].

Подібно до дорослого кісткового мозку популяція ГСПК пуповинної крові досить гетерогенна. Переважна більшість CD34⁺ клітин експресує як HLA-DR, так і

CD38 [53, 64, 65, 66]. Однак повідомляється, що найпримітивніші ГСПК не експресують HLA-DR та CD38 [67–70]. Вміст незрілих ГСПК із фенотипом $CD34^+HLA-DR^-$ та $CD34^+CD38^-$ у пуповинній крові більший, ніж у дорослому кістковому мозку [66]. На відміну від LTC-IC дорослого кісткового мозку, LTC-IC пуповинної крові експресують як CD34, так і HLA-DR [64], що свідчить про можливу невідповідність імунофенотипу дорослих та фетальних клітин цієї лінії. Прогенітори із більшим проліферативним потенціалом спостерігаються серед фракції клітин, позитивних на HLA-DR [64].

Деякі молекули адгезії, притаманні $CD34^+$ клітинам кістковому мозку, присутні і на відповідних клітинах пуповинної крові. Практично всі $CD34^+$ клітини несуть такі лейкоцитарні маркери, як CD11a, CD18, LFA-1 ліганд, ICAM-1. Експресія LFA-3 (CD58) добре виражена на $CD34^+$ клітинах пуповинної крові. Інтегрин сімейства $\beta 1$, що є важливим для адгезії клітин із екстраваскулярним матриксом, також присутній на $CD34^+$ клітинах, особливо VLA-4 та VLA-5 інтегрини. CD44 та LAM-1, що є рецепторами адгезії, які залучені у хоумінг гемопоетичних клітин, експресуються на $CD34^+$ клітинах пуповинної крові [71].

Гемопоетичні прогенітори експресують CD45RA і CD71 маркери, які можуть бути використані для отримання популяцій, збагачених на комітовані прогенітори. CD45RA експресується як на лімфоїдних, так і на грануло-моноцитарних прогеніторних клітинах [72] та "ненавчених" Т-лімфоцитах, які втрачають його експресію, коли стають клітинами пам'яті, але здатні відновлювати експресію у випадку відсутності контакту із антигеном протягом терміну більшому за один місяць [73]. CD71 – маркер еритроїдного диференціювання [74]. $CD34^+CD45RA^{low/-}$ та $CD34^+CD71^{low/-}$ клітини пуповинної крові збагачені на такі, що дають значний ріст, CFU-GEMM, $CD34^+CD45RA^+CD71^{low}$ клітини – на грануломоноцитарні прогенітори, а $CD34^+CD45RA^{low}CD71^+$ – на еритроїдні, що дають ріст BFU-E та CFU-E [75, 76]. $CD34^+$ клітини пуповинної крові, що експресують CD90 (Thy-1), здатні відновлювати гемопоез у імунодефіцитних мишей [32]. Всі LTC-IC клітини пуповинної крові разом із $CD34$ клітинами експресують Thy-1. Серед $CD34^+CD45RA^{low}CD71^{low}$ клітин 20 – 30 % експресує Thy-1 [30]. Така популяція

CD34⁺CD45RA^{low}CD71^{low}Thy-1⁺ клітин збагачена на HPP-CFC. ГСПК також експресують CD117 (c-kit) [77, 78] на рівні біля 60 % [79]. Така популяція CD34⁺c-kit⁺ клітин має вищу клоногенну активність в напівтвердих середовищах у порівнянні із CD34⁺c-kit⁻ клітинами. До того ж, всі CD34⁺Thy-1⁺ клітини також експресують c-kit, однак на низькому рівні [80]. Ліганд до c-kit (фактор стовбурових клітин) важливий для життєздатності та проліферації ГСПК пуповинної крові [78]. Переважна більшість CD34⁺ клітин (90%) коекспресує FLT3 (CD135) – рецептор до FLT3-ліганда [81]. Гемопоетичні прогеніторні клітини мають високу експресію Р-глікопротеїну, активність якого можна визначити за допомогою барвника Родамін-123, який є суправітальним флюорохромом, що зв'язується із мітохондріями живих клітин та є субстратом для Р-глікопротеїну [82]. 80 % CD34⁺ клітин ідентифікують як Rh^{high} та 20 % - Rh^{low} за допомогою барвника Родамін-123 [83]. Клітини пуповинної крові із фенотипом CD34⁺Thy-1⁺c-kit^{low} також мають маркер Rh^{low} [80], і всі клітини, що сприяють росту LTC-IC, присутні серед цієї популяції [83].

Показано, що CD34⁺ клітини експресують ранні маркери CD133, CD90 та CD34⁺CD38⁻ (маркер стовбурових гемопоетичних клітин) і маркери диференціювання CD117 та CD38 [54, 28, 84–86]. У пуповинній крові вміст CD34⁺CD38⁻ клітин серед всіх CD34-позитивних клітин більший, ніж в кістковому мозку [87]. Відомо, що найбільш ранні кровотворні клітини можуть бути CD34-негативними [88]. Так, клітини із фенотипом CD34⁻CD133⁺ із пуповинної крові мають властивості стовбурових клітин [89, 90]. CD34⁻CD133⁺ можуть починати експресувати CD34 при культивуванні *in vitro* [91]. CD34⁻CD133⁺ клітини пуповинної крові, можливо, представленні більш ранніми попередниками, ніж CD34⁺CD133⁺ [92]. В популяції клітин CD34⁺CD38⁻ виявляється експресія антигенів CD133 та CD34⁺CD38⁻. Профіль експресії CD34⁺CD38⁻ є схожим із CD133, однак не є ідентичним: 99% CD34⁺CD38⁻ позитивних клітин експресують також CD133 та 81% – CD133⁺. Виявляють також популяцію клітин із фенотипом CD34⁻CD133⁻ [84]. В пуповинній крові виявляється більша кількість клітин із імунофенотипом CD34⁻CD38⁻CD133⁺, ніж CD34⁻CD38⁻CD133⁻, однак вміст CD38⁻ клітин суттєво нижчий серед першої субпопуляції CD34⁻CD38⁻CD133⁺ клітин порівняно із останньою (CD34⁻CD38⁻CD34⁺CD38⁻CD133⁺). Значна частина

CD117 клітин коекспресує маркер CD34 [93]. Для клітин пуповинної крові із фенотипом $CD34^-CD38^-CD133^+$ та $CD34^-CD38^-CD34^+CD133^+$ характерна відсутність експресії CD117, що вказує на їх незрілість. Припускається, що найбільш ранні гемопоетичні клітини, що експресують CD45, можуть мати імунофенотип $CD34^-CD133^-CD38^-CD117^-LIN^-CD34^+CD133^+$ [94]. По мірі диференціювання таких клітин з'являються послідовно поверхневі маркери CD133, CD34 та CD38.

У пуповинній крові присутні також клітини, що комітовані у різні гемопоетичні напрямки, які поряд із CD34 експресують також лінійні маркери. Так, $CD34^+CD38^-$ клітини можуть експресувати антигени, що властиві лінійно-диференційованим клітинам. 70% клітин $CD34^-CD133^+$, що вважаються ранніми попередниками, експресують CD38. На відміну від кісткового мозку, де вміст $CD10^+$ та $CD19^+$ клітин серед $CD34^+$ клітин становить 25% та 18% відповідно, у пуповинній крові $CD34^+CD10^+CD19^+$ клітини є незначною популяцією [95]. CD10 є маркером В-клітин, що проліферують, та зрілих нейтрофілів, а CD19 – маркер В-лімфоїдних клітин, що з'являється на перших етапах диференціювання і не зникає на пізніх стадіях дозрівання. Так, ранні стадії комітованих в В-лімфоїдному напрямку клітин кісткового мозку характеризуються фенотипом $CD34^+CD19^+HLA-DR^+TdT^+CD10^+$ [23, 49, 55]. Більшість IgM^+ В-лімфоцитів пуповинної крові коекспресують CD5 [96], який є маркером Т- та В-лімфоїдних клітин [97]. Є дані, що 68% $CD19^+$ В-лімфоцитів пуповинної крові позитивні на CD5 [98]. Така популяція $CD5^+$ В-лімфоцитів відома як В1а лімфоцити [99]. $CD5^+$ В-лімфоцити пуповинної крові експресують низку маркерів, характерних для В-клітин, а саме: CD19, CD20, CD22, CD24, HLA-DR, рап-В та CD32, CD39, CD76, CD79, CD137, sIgM антигени [100, 101]. В1а лімфоцити розглядають як $CD5^+$, $CD9^+$, sIgM⁺ рап-В антиген-позитивні примітивні В-клітини. Недостатня кількість клітин пам'яті у пуповинній крові разом із іншими факторами лежить в основі повільного відновлення В лімфоцитів після трансплантації [102]. В пуповинній крові присутні клітини, що експресують маркер Т-лімфоїдних клітин CD3 [103,104]. $CD4^+$ Т клітини представляють 31% лімфоцитів, більшість з яких є $CD4^+CD45RA^+$ популяцією [104]. CD4 експресується на Т-лімфоїдних клітинах та на гемопоетичних прогеніторах різних стадій лінійного

комітування [105]. Т-клітини пуповинної крові примітивні, характеризуються низькою здатністю до антиген-специфічної відповіді та, в порівнянні із Т-клітинами дорослого організму, мають знижену здатність продукувати ІЛ-2, експресувати ІЛ-2R комплекси та HLA-DR [102]. NK клітини пуповинної крові мають фенотип $CD3^-CD56^+$, а також експресують CD2, CD7, CD11a-c, CD18, CD38, CD45RA та p75 ІЛ-2 рецептор. Серед такої популяції присутня лише незначна кількість $CD3^+CD16^-$ клітин [103, 106, 107]. Активність NK клітин нижча або подібна до відповідних клітин периферичної крові дорослих людей, однак у пуповинній крові лімфокін-активована активність у клітин-кілерів легко індукується цитокінами, такими як ІЛ-2 або ІЛ-12 [107, 108]

Міелоїдний маркер CD13 подібно до CD33 експресується на більшості $CD34^+$ клітин, однак він відсутній на більшості примітивних $CD34^+$ клітин. Є дані, що деяка частка ГСПК пуповинної крові, кісткового мозку та мобілізованої периферичної крові коекспресує CD34 та CD235, при цьому рівень їхньої експресії не відрізняється [51]. Хоча не у всіх роботах виявляли коекспресію CD34 та CD235 на клітинах пуповинної крові [52], при цьому продемонстрували експресію CD36 (маркер еритроїдних прогеніторів) в незначній кількості на $CD34^+$ клітинах [109, 110]. В інших роботах показано, що в пуповинній крові присутні клітини з фенотипом $CD34^+CD71^+$, які є ранніми еритроїдними прогеніторами [81], але їх менше, ніж міелоїдних клітин-попередників [52].

В пуповинній крові спостерігається більша кількість клітин з фенотипом $CD34^+CD7^+$, ніж в кістковому мозку та «мобілізованій» периферичній крові [55, 23], однак в деяких працях виявляли однакову кількість $CD34^+CD7^+$ клітин в пуповинній крові, кістковому мозку та периферичній крові [51].

Узагальнюючи вищенаведені дані, можна підсумувати, що більшість примітивних ГСПК пуповинної крові є маленькими мононуклеарними клітинами із фенотипом $CD34^+CD133^+CD38^-Thy-1^+c-kit^{low}Rh^{low}HLA-DR^-CD31^+$, які не експресують гемопоетичних маркерів лінійного диференціювання. Ранні ГСПК можуть не експресувати навіть CD34. Більш комітовані $CD34^+$ клітини-попередники переважно позитивні за маркерами CD38, HLA-DR, CD11a, CD18, LFA-1 ліганд,

ICAM-1 та можуть експресувати лінійні маркери.

1.3. Імунофенотип ГСПК фетальної печінки людини

Фетальна печінка людини містить клітини, що експресують CD117 та CD34. В фетальній печінці із строком гестації збільшується кількість CD123 позитивних клітин. Експресія CD123 спостерігається на стовбурових клітинах та на гемопоетичних прогеніторних клітинах різних субпопуляцій [111]. HLA-A, HLA-B та HLA-C антигени експресуються на всіх ядерних клітинах печінки строком від 9 до 24 тижнів гестації. HLA-DR антиген експресується лише на 50% таких клітин [112]. Із 5 по 18 тиждень гестації у фетальній печінці присутні субпопуляції клітин, які експресують CD117, CD90, CD34, CD123, CD45, CD14, CD235, при цьому рівень експресії може варіювати в залежності від терміну. Ізольовані CD117⁺CD34⁺CD90⁻ клітини *in vitro* при культивуванні із HGF (гепатоцитарний ростовий фактор) та EGF (епідермальний ростовий фактор) здатні до диференціювання у клітини, що експресують на рівні мРНК та білка маркери, притаманні гепатоцитам та холангіоцитам. [113]. Фетальна печінка містить гемопоетичні прогенітори із різною інтенсивністю експресії CD34 та CD38. Так, при вивченні фенотипових та функціональних характеристик колоніє-утворювальних клітин (CFCs), примітивних клітин, що дають ріст тривалим культурам (LTC-ICs) та лімфоїдних попередників, показано, що в тканині присутні клітини з різним рівнем експресії основного маркера: CD34⁺, CD34⁺⁺ та CD34⁺⁺⁺. Частина CD34⁺⁺ клітин несуть CD38 та HLA-DR. CFCs фетальної печінки мають імунофенотип CD34⁺⁺⁺CD38⁺HLA-DR⁺. При цьому 40% CFCs належать до еритроїдних попередників, що мають вищий за відповідні клітини дорослого кісткового мозку проліферативний потенціал. LTC-ICs фетальної печінки мають фенотип CD34⁺⁺CD38⁻HLA-DR⁺. Популяція клітин CD34⁺⁺CD38⁻HLA-DR⁺ містить 3,7% LTC-ICs, а також примітивні лімфоїдні прогенітори, що здатні диференціюватись в NK клітини. Тож, примітивні прогенітори фетальної печінки, такі як LTC-IC та ранні попередники NK клітин характеризуються фенотипом CD34⁺⁺CD38⁻HLA-DR⁺, серед яких, як припускається, містяться і

стовбурові клітини [114].

Загалом гемопоетичні прогенітори фетальної печінки експресують високий рівень CD38. Показано, що CD34⁺CD38⁺ клітини мають обмежений проліферативний потенціал [21] в той час, як CD34⁺CD38⁻ клітини містять HPP-CFC [20]. Сортуння CD34⁺CD38⁻ клітин за експресією CD33 збагачує їх на HPP-CFC. HPP-CFC клітини є гетерогенними за експресією HLA-DR, однак не виявлено різниці у проліферативних та клоногенних властивостях між популяціями HLA-DR⁺ та HLA-DR⁻. Присутність HLA-DR на комітованих та мультилінійних прогеніторах продемонстровано в багатьох дослідженнях [115–121]. Такі роботи показують, що більша частина міелоїдних та еритроїдних прогеніторів експресує HLA-DR. Однак загалом HLA-DR⁺ та HLA-DR⁻ популяції клітин відрізняються тим, що серед HLA-DR⁻ клітин присутні дуже ранні високопроліферативні прогенітори [69, 22].

Популяція клітин CD34⁺CD33⁻HLA⁻DR⁻CD38⁻, яка, вважалося, містить стовбурові клітини, рідко зустрічається у фетальній печінці і майже не містить колоніє-утворювальних клітин. Таким чином, припускають, що стовбурові клітини містяться серед CD33⁺ фракції клітин. Маркери CD33 та CD13 експресуються фетальними гемопоетичними стовбуровими клітинами [22] на відміну від таких клітин дорослого організму [122–124]. CD33 експресується не лише на міелоїдних клітинах, так, наприклад, CD5⁺CD2⁺ фетальні тимоцити із активністю Т-клітин та НК-клітин позитивні на CD33. Всі CD4⁺CD34⁺⁺lin⁻ клітини, що диференціюються у міелоїдному, Т- та В-лімфоїдному напрямках, були позитивні на CD33 та CD13. Проточна цитофлюорометрія фракції CD34⁺CD33⁺CD38⁻lin⁻ клітин фетальної печінки показала, що ці клітини також позитивні за CD13 та переважно характеризуються фенотипом Thy-1⁺, CD45RA⁻, CD45RO⁻, CD71⁻ та гетерогенністю за експресією c-kit. Тож, HPP-CFC клітини фетальної печінки представляють собою гетерогенну популяцію примітивних міелоїдних прогеніторів, що включають дуже ранні високопроліферативні прогенітори. HPP-CFC активність клітин, головним чином, спостерігається у популяції CD34⁺CD38⁻lin⁻ клітин, однак в деякій мірі також і серед CD38⁺ клітин. Тож, поява експресії CD38 на клітинах фетальної печінки пов'язана із диференціацією прогеніторів у низько проліферативні клітини.

Практично всі CFU-C, що детектуються у фетальній печінці, експресують CD33 та CD13. Фенотиповий аналіз показує, що лише 2% CD34⁺CD38⁻lin⁻ клітин негативні за CD33 та більшість із таких CD33⁻ клітин також негативні за HLA-DR. Також відмічається, що вміст колоніє-утворювальних одиниць дорослого кісткового мозку позитивно корелює із вмістом CD34⁺CD33⁺ клітин [122, 125, 126]. Деякі гемопоетичні стовбурові клітини кісткового мозку містяться у фракції CD33⁻ клітин, однак їх проліферація потребує додаткового застосування відповідного цитокінового коктейлю або факторів, що продукує строма кісткового мозку, тоді як CD33⁺ клітинам не потрібна цитокінова стимуляція [127]. Аутологічна трансплантація кісткового мозку із низьким вмістом CD33⁺ клітин призводить до повільного, однак стійкого відновлення гемопоезу. Припускають, що саме CD34⁺CD38⁻CD33⁺ клітини фетальної печінки людини містять стовбурові клітини [22]. Експресія Thy-1 спостерігається на більшості CD34⁺CD38⁻lin⁻ клітинах, а також на CD34⁺CD38⁺lin⁻. Гетерогенність за експресією c-kit спостерігається на CD34⁺lin⁻ клітинах фетальної печінки, і його експресія підвищується із підвищенням експресії CD34, хоча c-kit⁻ клітини спостерігаються серед CD34⁺CD38⁻lin⁻ клітин.

Як було вказано вище, гемопоетичні прогенітори фетальної печінки експресують CD4, що також властиво відповідним клітинам фетального кісткового мозку та пуповинної крові. Клітини фетальної печінки із високим та низьким рівнем експресії CD34 характеризуються експресією CD4. В фетальній печінці так само, як і в фетальному кістковому мозку та пуповинній крові, найвища експресія CD4 спостерігається на клітинах із самим високим рівнем експресії CD34, що не несуть CD7, CD38, CD45RA, CD71. CD4⁺ та CD4⁻ клітини однаково експресують HLA-DR. Вищий вміст HPP-CFC спостерігається у CD4⁺ клітин. Потенціал до диференціювання в еритроїдному напрямку спостерігається для CD4⁺ та CD4⁻ клітин, однак більша кількість BFU-E утворюється при культивуванні фракції CD4⁻ клітин. CD34⁺⁺CD4⁺ клітини містять мієлоїдні, еритроїдні, Т- та В-лімфоїдні прогенітори. CD4⁺CD34⁺⁺lin⁻ та CD4⁻CD34⁺⁺lin⁻ мають мультилінійний потенціал *in vivo*. Існують свідчення, що HPPC-CFU клітини із потенціалом до диференціювання в еритроїдні, мієлоїдні та НК клітини присутні у більшій мірі саме у фракції CD38⁺

клітин вміст якої є вищим в популяції CD34⁺⁺ клітин [128]. Фенотип клітин CD4⁺CD34⁺⁺lin⁻ подібний до фенотипу найбільш ранніх фетальних клітин та клітин дорослого організму: Thy-1⁺, c-kit⁺, CD7⁻, CD38⁻, CD45RA⁻, CD71⁻. Такі клітини також мають позитивну експресію CD123, CD33 та CD13. Мультипотентні попередники, що здатні до диференціації у мієлоїдному та лімфоїдному напрямках присутні у фракції c-kit⁺ клітин фетальної печінки, пуповинної крові та дорослого кісткового мозку [129, 130]. HPP-CFC фетальної печінки переважно спостерігаються серед фракції клітин із фенотипом CD34⁺CD33⁺CD13⁺CD38⁻CD45RO⁻CD45RA⁻CD71⁻lin⁻ [22].

Таким чином, під час активного кровотворення у фетальній печінці, що відбувається, головним чином, наприкінці першого та на початку другого триместру вагітності, спостерігається значна клієксть ГСПК. Для них характерними є експресія CD34, CD117, CD123, Thy-1⁺, CD33, CD13, CD4 та часткова експресія CD38, HLA-DR, при цьому переважна більшість клітин мають імунофенотип CD34⁺⁺, несуть CD33 та CD90, що є також властивим для ГСПК кісткового мозку, плаценти та пуповинної крові. У фетальній печінці присутні також комітовані мієлоїдні, еритроїдні, Т- та В-лімфоїдні прогенітори, що експресують відповідні лінійні маркери.

1.4. Функціональна активність ГСПК плацентарної тканини людини

Різний імунофенотип клітин в більшості випадків пов'язаний із відмінною функціональною активністю клітин *in vitro* та *in vivo*. Визначення колонієутворювальної активності (CFU) є одним із найбільш поширених методів для підрахунку кількості гемопоетичних клітин-попередників, встановлення їх функціональних особливостей, здатності до проліферації та мультипотентного диференціювання [131].

Сортовані CD34⁺CD45^{low} та CD34⁺⁺CD45^{low} клітини плаценти другого триместру гестації містять мультипотентні гематопоетичні прогенітори, що здатні утворювати мієлоїдні та еритроїдні колонії *in vitro*. Незалежно від терміну гестації

(автори не уточнюють клітини якого терміну аналізувались) $CD34^+CD45^{low}$ та $CD34^{++}CD45^{low}$ субпопуляції продукують переважно колонії CFU-GM (гранулоцитарні та макрофагальні колонієутворювальні одиниці) та незначну кількість CFU-GMEMM, що містять мієлоїдні та еритроїдні клітини [8]. Як показано в роботі [8], BFU-E (еритроїдні бурстоутворювальні одиниці) не спостерігаються як при культивуванні $CD34^+CD45^{low}$, так і $CD34^{++}CD45^{low}$ клітин. Ці дані навели авторів на думку, що плацентарні гемопоетичні прогенітори функціонально відрізняються від таких клітин фетальної печінки та кісткового мозку. Це може вказувати на особливості плацентарної ніші, що безпосередньо обумовлює властивості резидентних ГСПК [8].

Однак в іншій роботі повідомляється, що при культивуванні клітин плаценти першого та другого триместру, починаючи із 6 тижня гестації, утворюються колонії всіх мієло-еритроїдних напрямків. До того ж, частота утворення BFU-E залишається однаковою для клітин плаценти 6, 9 та 15 тижнів, тоді як із 9 тижня гестації спостерігається зростання CFU-GM та CFU-Mix до 10 разів. До 9 тижня CFU-GM та CFU-Mix утворюються переважно із клітин фракції $CD34^-$, а для плацент 15 та 38 тижня – переважно із $CD34^+$ клітин. Зазначено, що колонії утворені клітинами фетального походження [17].

Популяція $CD34^{++}CD45^{low}$ клітин зрілої плаценти не давала колоній, тоді як $CD34^+CD45^{low}$ клітини продукували незначну кількість грануло-моноцитарних та змішаних колоній. Слід зазначити, що на відміну від клітин першого та другого триместру гестації популяція $CD34^+CD45^{low}$ клітин із зрілої плаценти утворювала малу кількість еритроїдних колоній BFU-E, однак достатню - для їхнього виявлення [16].

В іншій роботі показано, що клітини, виділенні при дії колагенази, як на судини плаценти, так і на цілісну тканину плаценти, при культивуванні дають початок усім типам колоній, а саме: BFU-E, CFU-G (гранулоцитарні колонієутворювальні одиниці), CFU-GM, CFU-M (моноцитарно/макрофагальні колонієутворювальні одиниці) та змішаним колоніям CFU-Mix. Сумарна кількість колоній нижча на відміну від пуповинної та плацентарної крові.

В роботі, де вивчались $CD34^{++}CD45^{low}$ клітини зрілої плаценти також продемонстровано здатність до утворення ними різних типів колоній *in vitro*, включаючи BFU-E, CFU-E (еритроїдні колонієутворювальні одиниці), CFU-GM та CFU-GEMM (гранулоцитарні, еритроцитарні, моноцитарно/макрофагальні, мегакаріоцитарні колонієутворювальні одиниці) [9], проте ці результати є протиріччям щодо роботи [16]. Клітини після двох тижнів культивування у середовищі MethoCult експресували маркери мієлоїдних та еритроїдних клітин: CD45, CD25 (маркер лімфоцитів/моноцитів), CD51/CD61 (маркер мегакаріоцитів/тромбоцитів), CD235 (маркер еритроцитів). Такі колонії на 90 % складались із фетальних клітин [9].

При культивуванні $CD34^{++}CD45^{low}$ клітин в середовищі, що підтримує ріст лімфоїдних клітин на 21 добу спостерігали незначний рівень $CD56^{+}$ лімфоїдних клітин, які експресують CD45. До того ж, при цьому спостерігається мінорна субпопуляція В-лімфоїдних $CD19^{+}$ клітин, які експресують CD10 і є негативними за CD20 та sIgM, що свідчить про їх неповне диференціювання. Проте після культивування $CD34^{++}CD45^{low}$ клітин виявлено значне диференціювання в мієлоїдні $CD33^{+}$ прогенітори, в той же час клітини еритроїдного ряду не були детектовані. Більшість $CD33^{+}$ клітин експресують маркер дендритних клітин, а саме CD83 та CD86. $CD34^{++}CD45^{low}$ клітини диференціюються в еритроїдному та мієлоїдному напрямках при культивуванні у середовищі, що підтримує ріст мієло-еритроїдних клітин на 21 добу, однак вони нездатні до диференціювання у $CD56^{+}$ та $CD19^{+}$ лімфоїдні клітини. Виявлення здатності до диференціювання в еритроїдному напрямку проведено авторами за допомогою проточної цитофлюориметрії із використанням CD235. Показано, що 50–75% клітин у вищезазначеному середовищі стає еритроїдними, однак лише 1–5% $CD33^{+}$ клітин експресує CD14 [8]. Співкультивування $CD34^{++}CD45^{low}$ клітин із лінією мишиних стромальних клітин MS-5 протягом 2 – 4 тижнів спричиняє активне диференціювання у В-клітини, що несуть CD19, CD20 та sIgM.

Вживання та ріст ГСПК регулюється цитокінами та іншими компонентами середовища. ГСПК різних стадій розвитку організму по різному відповідають на

такі регулятори. При вивченні ГСПК плаценти 19 тижня гестації було виявлено вплив сироватки на здатність продукувати колонії. Автори показують, що за наявності в середовищі сироватки, утворення CFU-GM вище на відміну від безсироваткових умов культивування клітин за наявності факторів росту, при цьому вищий вміст сироватки призводить до утворення більшої кількості таких колоній. Однак сироватка не впливає на різницю в утворенні CFU-mix. Хоча ГСПК фетальної печінки навпаки дають більшу кількість колоній у середовищі без сироватки із факторами росту. Тож, автори дійшли до висновку, що плацентарні гемопоетичні прогенітори мають різні потреби в компонентах ростових середовищ у порівнянні із такими клітинами, виділеними із фетальної печінки та пуповинної крові [8, 5].

Через 10-12 тижнів після трансплантації $CD34^{++}CD45^{low}$ клітин плаценти (перших триместрів гестації) мишам імунодефіцитної лінії NOD/SCID в кістковому мозку спостерігаються донорські мієлоїдні, еритроїдні, магакаріоцитарні та лімфоїдні клітини. Також слід відзначити, що поряд із диференційованими клітинами крові детектуються $CD34$ та $CD133$ прогенітори. При трансплантації $CD34^{+}CD45^{low}$ клітин тим же реципієнтам при аналізі не спостерігається донорських клітин, що пояснюють характерною для таких клітин більшою зрілістю. [10]. Варто підкреслити, що в даній роботі [10] автори не проводили трансплантацію популяції клітин з фенотипом $CD34^{++}CD45^{low}$ разом із $CD34^{+}CD45^{low}$ клітинами. Інші автори також показали, що як $CD34^{+}$ так і $CD34^{-}$ клітини плаценти 6 тижня гестації містять клітини, що здатні відновлювати гемопоез на моделях NOD/SCID мишей. При цьому після трансплантації незрілі $CD34^{+}CD38^{-}$ та диференційовані $CD45^{+}$ клітини, що експресують маркери мієлоїдних та В-лімфоїдних клітин, детектуються у крові, кістковому мозку та селезінці. При культивуванні клітин кісткового мозку тварин після трансплантації клітин плаценти людини виявляли утворення усіх типів колоніє-утворювальних одиниць (КУО), за виключенням CFU-Mix. Автори підтвердили, що всі гемопоетичні клітини людини, що прижилися в організмі миші та КУО кісткового мозку, мали плодове походження. До того ж, автори продемонстрували, що клітини зрілої плаценти людини також здатні до приживлення в імунодефіцитних мишах, про що свідчила наявність через 5 місяців

після трансплантації відповідних CD45⁺ клітин у крові, та особливо у кістковому мозку і селезінці мишей, багато з них були В-лімфоїдними та деяка кількість – міелоїдними клітинами [17]. Наявність клітин людини в крові, кістковому мозку та селезінці детектували через 80 днів після трансплантації несортованої популяції ядромісних клітин плаценти людини, отриманих ферментативним шляхом, мишам лінії NOD/SCID [9].

Тож, ГСПК плаценти протягом всього періоду внутрішньоутробного розвитку проявляють мультипотентний потенціал як в умовах *in vitro*, так і *in vivo*. Представлені в літературних джерелах відомості щодо типів колоній, які утворюють ГСПК плаценти, дещо суперечливі, до того ж не наведено кількісних даних щодо співвідношення різних типів колоній.

Таким чином, аналізуючи доступні літературні дані можна зробити висновок, що ГСПК зрілої плаценти майже не вивчені. Методом проточної цитофлюориметрії проаналізували лише три маркери (CD34, CD45 та CD38), але мала панель маркерів не достатня для з'ясування особливостей клітин. Експресія таких маркерів як CD133, CD90 на клітинах тканини зрілої плаценти досліджували лише методом імуногістохімії, що не дозволяє провести належний кількісний аналіз. Слід зазначити, що конфокальна мікроскопія не дозволяє провести багатопараметричне імунофенотипування, тому не встановлено експресію CD45, CD33, HLA-DR на CD34⁺, CD133⁺, CD34⁺CD90⁺, CD133⁺CD90⁺ клітинах [9]. Це, в свою чергу, не дає підстави відносити детектовані клітини до гемопоетичних прогеніторів, оскільки відомо, що маркери CD133 та CD34 притаманні клітинам цитотрофобласту, який є CD45⁻ та HLA-DR⁻.

У плаценті першого та другого триместру гестації присутні міелоїдні та еритроїдні попередники. У тканині другого триместру знаходять НК клітини, тоді як експресію лімфоїдних маркерів не спостерігають, однак виявляють клітини, що при культивуванні здатні диференціюватись у лімфоїдному напрямку. У роботах автори не завжди уточнюють термін гестації, однак у наведених ілюстрованих матеріалах представлені дані для плацент першого та другого триместру гестації. Тож, або для зрілої плаценти даних про наявність комітованих клітин взагалі немає, або вони не

наведені.

Цікаво, що фетальна печінка у період активного гемопоезу містить велику кількість CD33⁺ клітин. Такі клітини також притаманні для плаценти, кісткового мозку та пуповинної крові, і зазвичай вони багаті на HRP-CFC. До того ж є дані, що кількість ранніх мієлоїдних ГСПК є важливим показником загального обсягу колоніє-утворювальних клітин в алотрансплантатах [132].

Повністю відсутні літературні дані щодо морфології ГСПК як для плаценти першого та другого триместру гестації, так і для зрілої тканини. Однак, як описано вище, для пуповинної крові, врахування морфологічних характеристик є обов'язковою умовою правильної ідентифікації ГСПК.

Із всього викладеного вище випливає, що клітини ГСПК різних джерел, таких як пуповинна кров, кістковий мозок та фетальна печінка в цілому мають подібний імунофенотип, а відмінності переважно пов'язані із кількісним співвідношенням різних субпопуляцій. Функціональна активність гетерогенної популяції ГСПК із таких джерел відповідно також відрізняється, що спостерігається при використанні клітин як трансплантаційного матеріалу. При трансплантації ГСПК пуповинної крові спостерігається відтерміноване відновлення нейтрофілів, тромбоцитів та лімфоцитів, однак менший ризик виникнення гострої та хронічної реакції «трансплантат проти хазяїна» на відміну від кісткового мозку, що обумовлено відсутністю прогеніторів на різних стадіях кровотворення та особливостями циркулювальних ГСПК. А більша кількість комітованих клітин у продуктах лейкоферезу, що отримують від донорів після G-CSF-мобілізації в порівнянні із кістковим мозком і пуповинною кров'ю обумовлює швидше приживлення клітин після трансплантації [132]. Тож, порівняльна характеристика резидентних ГСПК плацентарної тканини із відповідними клітинами фетальної печінки та пуповинної крові, а саме їх гетерогенності та мультипотених властивостей, може дати додаткову інформацію щодо їх терапевтичного потенціалу.

Виходячи з вищезазначеного, випливає актуальність дослідження ГСПК зрілої плаценти та проведення порівняльного аналізу із ГСПК інших джерел. Для такого дослідження нами було обрано пуповинну кров, оскільки вона широко

використовується для трансплантацій [3] та фетальну печінку, яка є гемопоетичним органом, що містить найвищу концентрацію CD34⁺ клітин у порівнянні із фетальним кістковим мозком, пуповинною кров'ю, дорослим кістковим мозком та «мобілізованою» периферичною кров'ю [133]. Як показано вище, імунофенотип ГСПК пуповинної крові та фетальної печінки є добре вивченим, що дозволяє проводити порівняльний аналіз та дає можливість краще зрозуміти властивості досліджуваних клітин. Схожість імунофенотипу, субпопуляційного складу ГСПК фетальної печінки, кісткового мозку та плаценти на першому і другому триместрі вагітності вказує, що на такому етапі гестації плацента є гемопоетичним органом, однак відсутні дані про відмінність та схожість ГСПК зрілої плаценти з відповідними клітинами вище наведених кровотворних тканин.

Оскільки плацента, що виконує бар'єрну функцію, може накопичувати інфекційні агенти перед клінічним використанням необхідно проводити її ретельне обстеження [14]. Також плацента при фізіологічних родах може бути контамінована умовно-патогенною мікрофлорою породіллі, що вказує на необхідність проведення контролю бактеріальної та грибової флори після виділення клітин. Виконання таких досліджень займає близько 10 діб, тому для оптимізації первинного відбору матеріалу для виділення клітин для медичного застосування можна використовувати методи низькотемпературного кріоконсервування. Такий підхід дозволяє створювати банки та проводити скринінг тканини за критеріями, необхідними для використання, крім того, плацента доступна для негайного використання [14]. Тож, безперечно необхідним є пошук методів кріоконсервування тканини плаценти, як джерела ГСПК, для майбутнього клінічного використання.

Тому, дана робота була спрямована на вивчення імунофенотипових характеристик та потенціалу до диференціації *in vitro* ГСПК зрілої плаценти у порівнянні із ГСПК пуповинної крові та фетальної печінки та на отримання життєздатних та функціонально активних ГСПК із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Виділення фракції мононуклеарних клітин із тканини зрілої плаценти

Дослідження, що проводились із тканиною людини, були узгоджені із біоетичним комітетом Інституту клітинної терапії (№ 3–13). Плаценту (n=17) отримували після пологів (фізіологічних або шляхом кесаревого розтину) на 39 – 41 тижні вагітності у 23–36-річних жінок з їх інформованої згоди в Київському пологовому будинку №3. Час транспортування плаценти складав не більше 3 годин, транспортування проводили в лотку, що не містив будь-яких розчинів. Плаценту брали у донорів, в крові яких не містилось поверхневого (HBsAg) та корового (coreHBV) антигенів вірусу гепатиту В, РНК вірусу імунодефіциту людини 1/2 (HIV 1/2), РНК вірусу гепатиту С (HCV), сумарних антитіл проти *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii* та цитомегаловірусу, а тканина плаценти була негативна на ДНК *Chlamidium trachomatis*, *Mycoplasma genitalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, ДНК цитомегаловірусу та вірусу простого герпесу 1 та 2 типу (HSV-1/2). Тканину плаценти тестували на наявність аеробних, анаеробних бактерій, а також грибової інфекції. Для виділення клітин плаценту очищали від амніотичної оболонки та відрізали пуповину. Для дослідження вирізали фрагмент тканини вагою близько 50 г на відстані близько 4 см від пуповини. Плацентарну тканину переносили в стерильний стакан об'ємом 100 мл та інкубували у стерильному розчині Хенкса з додаванням 50 од/мл амфотерицину (Синтез, Україна), 100 од/мл бензилпеніциліну (Артеріум, Україна), 50 мкг/мл стрептоміцину (Артеріум, Україна) протягом 15 хв, після чого переносили тканину в стакан об'ємом 100 мл та промивали розчином Хенкса з додаванням 100 од/мл бензилпеніциліну та 50 мкг/мл стрептоміцину (Артеріум, Україна). Тканину знов переносили в стакан об'ємом 100 мл та подрібнювали стерильними ножицями на фрагменти 1-3×1-3×1-3 мм, які

промивали розчином Хенкса об'ємом 1 – 1,5 л з додаванням 100 од/мл бензилпеніциліну та 50 мкг/мл стрептоміцину для видалення залишків крові до повного знебарвлення розчину.

Тканину ферментували двома методами. Згідно методу №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. Після цього плацентарні клітини збирали у пробірку шляхом фільтрування через клітинний фільтр з діаметром пор 70 мкм (Becton Dickinson, США). Тканину, що залишалась на фільтрі переносили у чисту пробірку. До суспензії клітин, що була отримана після фільтрування додавали фетальну бичачу сироватку (ФБС, HyClone, USA) та відмивали клітини в PBS з додаванням 1 мг/мл BSA шляхом центрифугування при 400g протягом 5 хв та ресуспендування в тому ж розчині. Тканину, що залишилась, інкубували зі свіжою порцією ферментів протягом 20 – 40 хв при +37° С. Після фільтрування до суспензії клітин також додавали ФБС та відмивали. Фракцію клітин, що була отримана в обох стадіях ферментування об'єднували.

За методом №2 відмиту за вищеописаним способом тканину ферментували за допомогою 0,1% коллагенази та 0,6 Од/мл диспази I (Gibco, Germany) у ростовому середовищі ДМЕМ (Sigma, USA) з додаванням 5 мМ HEPES (Biomedicals, France) протягом 20 – 30 хв при +37° С. Після ферментування додавали ФБС та відмивали клітини в ДМЕМ з додаванням 5 мМ HEPES шляхом центрифугування при 400g протягом 5 хв. Клітини ресуспендували у ДМЕМ з 5 мМ HEPES.

Фракцію мононуклеарних клітин отримували шляхом фракціонування на фіколі (щільність 1,077 г/мл, Biochrome, Німеччина). Для цього суспензію клітин розбавляли PBS з додаванням 1 мг/мл BSA до концентрації 3×10^5 клітин/мл, фільтрували через клітинний фільтр з діаметром пор 40 мкм, нашаровували на фікол у пробірки об'ємом 50 мл у співвідношенні 1:4 та центрифугували при 400 g 30 хв. Отримані клітини у кільці між розподілом фаз відбирали у пробірку та відмивали від фіколу з використанням PBS з 1 мг/мл BSA двічі шляхом центрифугування, як

описано раніше.

2.2. Виділення фракції мононуклеарних клітин із фетальної плаценти плодів людини першого триместру гестації

Джерелом фетальної плаценти (n=1) був абортівний ембріон людини 7-8 тижнів гестації, отриманий в результаті добровільного переривання вагітності з інформованої згоди жінки. Використання фетальної тканини для досліджень було схвалено біоетичним комітетом Інституту клітинної терапії (№ 3–13). Тканина хоріону була негативна на ДНК вірусу гепатиту В (HBV) та РНК вірусу імунодефіциту людини 1/2 (HIV-1/2), ДНК цитомегаловірусу, *Toxoplasma gondii*, *Chlamidium trachomatis*, *Mycoplasma genitalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* та вірусу простого герпесу 1 та 2 типу. Для виділення клітин тканину хоріона вагою 1 – 3 г очищали від амніотичної оболонки та кров'яних згустків і відмивали в стерильному розчині Хенкса в чашках Петрі діаметром 90 мм з додаванням 100 од/мл бензилпеніциліну та 50 мкг/мл стрептоміцину до повного знебарвлення розчину для промивання. Тканину переносили в стерильну пробірку об'ємом 30 мл та подрібнювали стерильними ножицями на фрагменти 1-3 мм. Потім тканину обробляли розчином ферментів: 0,2 % колагенази I, 0,35 мг/мл гіалуронідази, 100 од/мл DNase I з додаванням 1 мг/мл BSA протягом 15 – 30 хв при +37 °С. Після цього клітини збирали шляхом фільтрування через клітинний фільтр з діаметром пор 70 мкм. Клітини після ферментування відмивали в PBS з додаванням 1 мг/мл BSA. Тканину, що залишилась, інкубували зі свіжою порцією ферментів протягом 30 – 40 хв при +37 ° С. Відмивання клітин, їх об'єднання та виділення фракції мононуклеарних клітин проводили так само, як для клітин зрілої плаценти, що описано у розділі 2.1.

2.3. Виділення фракції мононуклеарних клітин із пуповинної крові

Пуповинну кров збирали із пупочного канатика новонародженого за

стандартною методикою під час пологів на 39 – 41 тижні у 23–36-річних жінок з їх інформованої згоди. Донорами пуповинної крові (n=15) були жінки, в крові яких не містилось поверхневого (HBsAg) та корового (corHBV) антигенів вірусу гепатиту В, РНК вірусу імунодефіциту людини 1/2 (HIV 1/2), РНК вірусу гепатиту С (HCV), сумарних антитіл проти *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii* та цитомегаловірусу (CMV) та сама пуповинна кров була негативна на антигени поверхневого (HBsAg) та корового (corHBV) вірусу гепатиту В, РНК вірусу імунодефіциту людини 1/2 (HIV 1/2), ДНК цитомегаловірусу, РНК вірусу гепатиту С (HCV) та антитіла до вірусу імунодефіциту людини 1/2 (HIV 1/2), вірусу гепатиту С (HCV), *Treponema pallidum*. Пуповинну кров тестували на наявність аеробних, анаеробних бактерій, а також грибкової інфекції.

Пуповинну кров із пакету для забору крові, що містив консервант CPDA-1 (в складі цитрат натрію дигідрат, кислота лимонна моногідрат, натрію дигідрофосфату моногідрат, глюкоза моногідрат, аденін та вода для ін'єкцій) переносили у пробірку, розводили PBS у співвідношенні 1:4 та нашаровували на фікол. Отримані клітини у кільці між розподілом фаз відбирали у пробірку та відмивали від фіколу з використанням PBS з 1 мг/мл BSA двічі шляхом центрифугування при 400g протягом 5 хв. Для того, щоб усунути потенційну різницю у результатах аналізів проточної цитофлюориметрії, викликану впливом ферментативної обробки на плацентарні клітини, отриману фракцію мононуклеарних клітин з пуповинної крові обробляли такою ж сумішшю ферментів, як і тканину плаценти за методом №1 протягом 50 хв при 37 °С. Клітини відмивали від залишків ферментів в PBS з додаванням 1 мг/мл BSA.

2.4. Виділення фракції ядровмісних клітин з пуповинної крові

Пуповинну кров (n=134) збирали за вищеописаним методом. До пакету, що містив пуповинну кров із цитратним буфером додавали розчин 6 % гідроксиетилкрохмалю у певному співвідношенні та седиментували при кімнатній температурі до чіткого розділення фракції еритроцитів та ядровмісних клітин, після

чого фракціонували на екстракторі плазми XR 100 (Jouan, Франція) та центрифугували при 400g протягом 20 хв. Осад клітин ресуспендували в вихідному розчині.

2.5. Отримання суспензії клітин фетальної печінки плодів людини першого триместру гестації

Джерелом фетальної печінки (n=7) були абортівні ембріони людини 7-12 тижнів гестації, отримані в результаті добровільного переривання вагітності з інформованої згоди жінок. Суспензію клітин фетальної печінки отримували шляхом гомогенізації в гомогенізаторі Поттера в розчині Хенкса з наступним фільтруванням через клітинний фільтр з діаметром пор 100 мкм.

2.6. Отримання мобілізованої периферичної крові

Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) отримували з проб периферичної крові (n=1) пацієнту з гострими нелімфобластними лейкозами в стадії ремісії з інформованої згоди, якому була проведена попередня процедура мобілізації ГСК з використанням відповідних мобілізуючих агентів і подальшим збором CD34⁺ клітин за стандартною методикою.

2.7. Кріоконсервування тканини зрілої плаценти людини

До відмитих за вищеописаним методом фрагментів тканини зрілої плаценти додавали розчин Хенксу у співвідношенні близько 3 мл на 1 г тканини. До тканини в розчині Хенксу додавали 1:1 1,5 М розчин ДМСО (Sigma, США) до кінцевої концентрації 0,7 М та розподіляли по 1,5 мл в кріоампули об'ємом 2 мл.

Кріоконсервування здійснювали за допомогою приладу програмного заморожувача ЗП-6.00.00.00 по триетапній програмі за методикою Г.С. Лобинцевої [134] та В.А. Шаблія [14], а саме процес охолодження починали з +20 °С зі

швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до температури $-4,5^{\circ}\text{C}$ – для $0,7\text{ М ДМСО}$. При такій температурі зразки витримували протягом 10 хв , після чого здійснювали ініціацію кристалоутворення. Після завершення кристалізації кріоконтейнери охолоджували зі швидкістю $0,3^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -35°C , потім – $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -50°C та $-10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -140°C . За температури -140°C процес охолодження в програмному заморозувачі зупиняли й переносили кріоампули у рідкий азот (-196°C) на довгострокове зберігання. Розморозування здійснювали на водяній бані ($+38\dots+40^{\circ}\text{C}$) до появи в кріоампулі рідкої фази (0°C).

2.8. Кріоконсервування пуповинної крові

До суспензії ядровмісних клітин пуповинної крові (див. підрозділ 2.3.), повільно додавали розчин $1,5\text{ М ДМСО}$ до кінцевої концентрації $0,7\text{ М}$ і розливали по $1,5\text{ мл}$ в кріоампули об'ємом 2 мл .

Кріоконсервування здійснювали за допомогою приладу програмного заморозувача ЗП-6.00.00.00 по триетапній програмі за методикою Г.С. Лобинцевої [134]. За температури -140°C процес охолодження в програмному заморозувачі зупиняли й переносили кріоампули у рідкий азот (-196°C) на довгострокове зберігання. Розморозування здійснювали на водяній бані ($+38\dots+40^{\circ}\text{C}$) до появи в кріоампулі рідкої фази (0°C).

2.9. Кріоконсервування фетальної печінки плодів людини першого триместру гестації

До суспензії клітин фетальної печінки, що отримували як описано раніше, повільно додавали розчин $1,5\text{ М}$ до кінцевої концентрації $0,7\text{ М}$ та розливали в кріоампули об'ємом 2 мл .

Кріоконсервування здійснювали за допомогою приладу програмного заморозувача ЗП-6.00.00.00 по триетапній програмі за методикою Г.С. Лобинцевої [134]. За температури -140°C процес охолодження в програмному заморозувачі

зупиняли й переносили кріоампули у рідкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) на довгострокове зберігання. Розморожування здійснювали на водяній бані ($+38\dots+40\text{ }^{\circ}\text{C}$) до появи в кріоампулі рідкої фази ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.10. Виділення ГСПК із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти

Тканину зрілої плаценти кріоконсервували та розморожували (див. підрозділ 2.7.). Клітини виділяли шляхом швидкої ферментативної обробки у розчині колагенази I (Serva, Німеччина) протягом 10 – 15 хвилин, розводили отриману суспензію клітин середовищем, що містила 1 – 2 % людської сироватки у співвідношенні 1 : (5 – 10), піпетували піпеткою Пастера. Плацентарні клітини збирали шляхом фільтрування через клітинний фільтр з діаметром пор 70 мкм (Becton Dickinson, США) і центрифугували при 300 g протягом 5 хв, осад клітин ресуспендували у 0,9 % NaCl.

Для фенотипування ГСПК плаценти кріоконсервовану тканину зрілої плаценти ферментували повністю, для чого застосовували суміш ферментів, яка містила 0,2 % колагенази I (Serva, Німеччина), 0,35 мг/мл гіалуронідази (Sigma, США), 100 од/мл DNase (Sigma, США). До суспензії клітин додавали людську сироватку та відмивали шляхом центрифугування при 400g протягом 5 хв і ресуспендували в тому ж розчині. Тканину, що залишилась, інкубували зі свіжею порцією ферментів, отриману суспензію також відмивали і фракції клітин, що отримували на обох стадіях ферментування об'єднували.

2.11. Культивування фракції мононуклеарних клітин нативної та кріоконсервованої плаценти в метилцелюлозо-вмісному та агаровмісному середовищах

Для дослідження колонієутворювальної здатності плаценти культивували нативні та кріоконсервовані зразки. Фракцію мононуклеарних клітин нативної плаценти отримували за методом №1 (див. підрозділ 2.1.). Кріоконсервовану

тканину розморожували відповідно до методики (див. підрозділ 2.7.). Фрагменти тканини разом з кріопротектором переносили в пробірки більшого об'єму та дуже повільно додавали розчин Хенксу для видалення ДМСО з тканини до кінцевої концентрації 0,07 М. Виділення клітин з кріоконсервованої тканини здійснювали як описано вище (див. підрозділ 2.10.).

Клітини культивували в кількості $5 \cdot 10^4$ на чашку Петрі діаметром 35 мм у дублікатах в метилцеллюлозо-вмісному середовищі MethoCult (Stem Cell Technologies, Канада) або в агар-вмісному середовищі при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂. Агаровмісне середовище містило наступні компоненти: середовище AIM-V (Gibco, Німеччина), 50 нг/мл SCF (stem cell factor), 10 нг/мл G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), 10 нг/мл GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), 10 нг/мл IL-3 (Interleukin-3), 9 нг/мл Epo (erythropoietin) (Biochrom, Німеччина), 30 % ФБС (Gibco, Німеччина) та 0,3 % агару. Для культивування клітин в агаровмісному середовищі спочатку готували суміш факторів росту з ФБС. Розплавляли 3,3% розчин агару на водяній бані та вносили необхідну кількість агару до ростового середовища піпетковими дозаторами з фіксованим об'ємом з нагрітими в термостаті кінцевиками та витримували пробірки на водяній бані +38 – 39 °С протягом 5 хв для охолодження. Суспензію клітин додавали до факторів росту з ФБС, об'єднували з ростовим середовищем, що містив агар та розливали в нагріті культуральні чашки Петрі.

Проводили спостереження за ростом колоній до 21-ї доби культивування за допомогою інвертованого мікроскопу СКХ41 (Olympus, Японія). Підрахунок колоній здійснювали на 14 добу росту. Колонії класифікували за визначником колоній, що утворюються після культивування гемопоетичних клітин [135] та ідентифікували як еритроїдні колонії: BFU-E, CFU-E; колонії попередників гранулоцитів та моноцитів: CFU-M, CFU-G, CFU-GM та змішані колонії: CFU-GEMM.

2.12. Культивування фракції ядровмісних клітин пуповинної крові в метилцеллюлозо-вмісному та агаровмісному середовищах

Для аналізу колоній ядровмісних клітин пуповинної крові культивували нативні та кріоконсервовані зразки. Ядровмісні клітини пуповинної крові, що були кріоконсервовані розморожували, (див. підрозділ 2.7.) та відмивали від кріопротектора шляхом додавання до суспензії клітин з кріопротектором розчину 2,5 % альбуміну людини (Біофарма, Україна) та 5 % Декстрану 40 (Юрія-Фарм, Україна) у розчині хлориду натрію 0,9 % дуже повільно по краплинах до кінцевої концентрації ДМСО 0,3 М. Суспензію центрифугували при 300 g протягом 10 хв. Клітини ресуспендували в розчині 2,5 % альбуміну людини та 5 % Декстрану 40. Клітини підраховували у камері Горяєва, які попередньо розводили розчином 2 % оцтової кислоти з метиленовим синім у співвідношенні 1:20.

Клітини культивували в кількості $5 \cdot 10^4$ на чашку Петрі діаметром 35 мм у дублікатах в метилцеллюлозо-вмісному середовищі MethoCult (Stem Cell Technologies, Канада) або в агар-вмісному середовищі при $+37^\circ\text{C}$ в атмосфері з 5% CO_2 . Культивування в агаровмісному середовищі проводили як для фракції моноклеарних клітин плаценти (див. підрозділ 2.11.). Проводили спостереження за ростом колоній до 21-ї доби культивування за допомогою інвертованого мікроскопу СКХ41 (Olympus, Японія). Підрахунок колоній здійснювали на 14 добу росту. Колонії класифікували за визначником колоній, що утворюються після культивування гемопоетичних клітин (див. підрозділ 2.11.).

2.13. Культивування «мобілізованої» периферичної крові в метилцеллюлозо-вмісному та агаровмісному середовищах

Для дослідження колонієутворювальної здатності «мобілізованої» периферичної крові культивували нативний зразок. Суспензію клітин розводили ростовим середовищем 1:4. Для підрахунку в камері Горяєва розводили розчином 2 % оцтової кислоти з метиленовим синім у співвідношенні 1:40

Клітини культивували в кількості $5 \cdot 10^4$ на чашку Петрі діаметром 35 мм у дублікатах в метилцеллюлозо-вмісному середовищі MethoCult (Stem Cell

Technologies, Канада) при +37 °C в атмосфері з 5% CO₂. Проводили спостереження за ростом колоній до 21-ї доби культивування за допомогою інвертованого мікроскопу СКХ41 (Olympus, Японія). Підрахунок колоній здійснювали на 14 добу росту. Колонії класифікували за визначником колоній, що утворюються після культивування гемопоетичних клітин (див. підрозділ 2.11.).

2.14. Фарбування гемопоетичних колоній азур-еозином

На 14 добу росту плацентарних клітин у агаровмісному середовищі колонії фіксували. Для фіксації поверхню середовища накривали нітроцелюлозним фільтром 0,22 мкм (Milipore, USA), промивали 3 рази розчином Хенксу та заливали водним розчином 4 % глютеральдегіду та 5 % формаліну на 10 хв. Після видалення фіксатора чашки Петрі промивали розчином Хенксу та залишали відкритими на ніч при кімнатній температурі. Фільтр знімали та заливали чашки Петрі метанолом на 10 хв, після чого промивали дистильованою водою. Колонії фарбували розчином Романовського (азур-еозин) 15 хв та промивали дистильованою водою.

2.15. Проточна цитометрія

Для імунофенотипування зрілих та фетальних плацентарних клітин, клітин пуповинної крові та клітин фетальної печінки отримані суспензії (див. підрозділ 2.1, 2.2, 2.3, 2.5) відмивали в буфері Cell Wash (BD, США). Для аналізу імунофенотипу клітин ПЕК пуповинної крові на 15-ту добу культивування ізолювали колонії із агаровмісного культурального середовища за допомогою піпеткового дозатора з фіксованим об'ємом під інвертованим мікроскопом. Колонії легко ресуспендувались та утворювали суспензію клітин, які відмивали в культуральному середовищі альфа-MEM та буфері Cell Wash (BD, США). Для проведення аналізу далі клітини інкубували при +4 °C протягом 30 хв із первинними моноклональними антитілами в робочій концентрації 0,5 мкг на 10⁶ клітин. Використовували такі флюорохром-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. Антитіла, що не зв'язані, відмивали в буфері Cell Wash. Аналізували лише популяцію живих клітин, які не забарвлювались барвником 7-AAD. Імунофенотипування проводили на лазерному проточному цитофлюориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програми FACSDiva 6.1.2, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 6 параметрів флуоресценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів при багатопараметричному аналізі 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).

У роботі використовуються поняття «рівню експресії» та «інтенсивності експресії». «Рівень експресії» – це кількість клітин, що експресує досліджуваний білок, а «інтенсивність експресії» показує інтенсивність флуоресценції досліджуваного білку, що мічений антитілами для певної популяції клітин. Для клітин із різною інтенсивністю експресії одного і того маркера вводили позначення «^{low}» та «^{hi}», або зазначали різну кількість знаків «плюс» біля назви маркера, а саме: для клітин із низькою інтенсивністю маркера – «⁺», із середньою інтенсивністю – «⁺⁺», із високою – «⁺⁺⁺».

2.16. Імуноцитохімічне дослідження

Для проведення імуноцитохімічного аналізу клітин ПЕК пуповинної крові на 14-ту добу культивування ізолювали колонії із агаровмісного середовища за допомогою піпеткового дозатора з фіксованим об'ємом під інвертованим мікроскопом та наносили у вигляді мазка на предметне скло, висушували та фіксували забуференим розчином 4 % параформальдегіду протягом 15 хв. Неспецифічне зв'язування антитіл блокували інкубуванням цитопрепаратів при кімнатній температурі в розчині 0,1 М фосфатного буфера, що містив 0,5 % BSA.

Для детекції глікофору А використовували флюорохром-мічені моноклональні антитіла anti-CD235a PE (Becton Dickinson, США) і для посилення сигналу візуалізації проводили зв'язування первинних антитіл із вторинними антитілами goat anti mouse-Alexa 488 (Invitrogen, Німеччина). Як контроль використовували цитопрепарати, які після блокування не інкубували з антитілами anti-CD235a PE, а витримували з вторинними антитілами goat anti mouse-Alexa 488. Візуалізацію зображень проводили на конфокальному лазерному скануючому мікроскопі FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

2.17. FISH аналіз

FISH аналіз проводили на клітинах колоній, що були отримані на 14-ту добу при культивуванні моноклеарної фракції клітин зразків нативної зрілої плаценти (див. підрозділ 2.1.) в метилцеллюлозо-вмісному середовищі MethoCult (див. підрозділ 2.11.) в кількості $2 \cdot 10^5$ на чашку Петрі діаметром 35 мм у дублікатах. Для аналізу брали плаценту від новонароджених чоловічої статі та проводили дослідження на двох зразках. Клітини колоній ізолювали із середовища за допомогою піпеткового дозатора з фіксованим об'ємом під інвертованим мікроскопом та відмивали від метилцеллюлозо-вмісного середовища у культуральному середовищі альфа-MEM (HyClone, USA) один раз. Кількість клітин для аналізу була не менше $6 \cdot 10^5$.

Клітини інкубували у теплому гіпотонічному розчині 0,56% KCl при $+37^\circ\text{C}$ протягом 15 хв після чого центрифугували при 300 g 8 хв. Отримані ядра ресуспендували у свіжевикотвленому фіксаторі Карнуа, ресуспендували та фіксували протягом 15 хв, центрифугували при 400 g протягом 8 хв та знов перерозчиняли у фіксаторі Карнуа з подальшим фіксуванням 5 хв. Ресуспендування повторювали 4 рази, після чого ядра знов центрифугували при 400 g 8 хв, залишали 0,5 мл супернатанту та ресуспендували. Ядра наносили по краплині на предметне скло SuperFrost Plus (Thermo Scientific, USA), яке розміщували на термоплитці $+37^\circ\text{C}$. Скельця із препаратами залишали в термостаті при $+37^\circ\text{C}$ на ніч.

На наступному етапі підготовували препарати для гібридизації із пробамми, для чого витримували скельця із ядрами у ДНК денатуруючому розчині 70% формаміду із 2×SSC (цитратно-сольовий буфер) при +73 °С протягом 5 хв. Далі проводили дегідратацію шляхом витримування скелець по черзі у 70%, 85% та 100% етанолі кімнатної температури протягом 2 хв у кожному та висушували на повітрі до повного випаровування спирту. На окреслену на скельці зону із ядрами наносили проби CEPX SpectrumOrange та CEPY SpectrumGreen (Abbot Molecular, USA), накривали чистим покривним склом та інкубували при +37 °С у вологому повітрі ніч. Далі скельця промивали у розчині 0,4×SSC із 0,3% NP-40 при 73°C протягом 2 хв та у розчині 2×SSC із 0,1% NP-40 при кімнатній температурі протягом 1 хв. Скельця висушували, наносили DAPI (Abbot Molecular, USA) на зону гібридизації та накривали покривним склом. Визначали відсоток ядер із сигналом X та Y хромосом. Для аналізу підраховували 300 ядер. Візуалізацію проводили на флюоресцентному прямому мікроскопі Zeiss Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, USA).

2.18. Статистична обробка результатів

У тексті результати представлені у вигляді середніх величин з 95 % довірчим інтервалом. Графічний вигляд результатів – це діаграми розмаху, які представляють центральну тенденцію кожної категорії змінної у вигляді медіани значень, а розмах (мінливість) в кожній групі відображають у вигляді мінімальних і максимальних значень. При обрахунку даних, які були виражені у відсотках, використовували кутове перетворення Фішера. Статистичну значимість відмінностей між вибірками визначали за допомогою U-критерію Манна–Уїтні. Середню помилку розраховували шляхом визначення достовірності відмінностей при альтернативному варіюванні. Для визначення статистичної значимості відмінностей визначали, чи розрізняються суттєво відносні частоти появи подій. Обробку експериментальних даних проводили з використанням програмного забезпечення «Microsoft Office Excel» та STATISTICA 8.0 program (StatSoft Inc. 2007, USA).

РОЗДІЛ 3

ПОРІВНЯЛЬНА ІМУНОФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ/ПРОГЕНІТОРИНИХ КЛІТИН ПЛАЦНЕТИ, ПУПОВИННОЇ КРОВІ ТА ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ

Існує дуже мало даних щодо імунофенотипу ГСПК зрілої плаценти. Ще не запропоновано єдиного протоколу їх імунофенотипування, який дозволив би стандартизувати оцінку якісного та кількісного складу популяцій ГСПК. До того ж, ГСПК зрілої плаценти ще не порівнювались із такими клітинами інших джерел. Тож, підбір протоколу аналізу та порівняльне дослідження імунофенотипу ГСПК зрілої плаценти є актуальним завданням, що має прикладне та фундаментальне значення.

3.1. Отримання гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин із тканини зрілої плаценти

В нашій роботі, як описано вище, виділення фракції моноклеарних клітин із зрілої тканини плаценти проводили двома методами. Метод №1 був модифікацією методу, що застосовувався в роботі [8], де використовували суміш ферментів колагенази, ДНКаз та гіалуронідази. Модифікація полягала в зменшенні концентрації гіалуронідази. Гіалуронідаза руйнує гіалуронову кислоту, яка робить розчин в'язким та заважає виділенню клітин на етапі фільтрування та центрифугування. Порівняння нами різних концентрацій гіалуронідази у суміші ферментів показало, що зменшення її кількості у два рази не впливає на процес виділення. Критерієм оцінки була легкість проведення етапу фільтрування та подальшого ресуспендування осаду клітин після центрифугування. Таким чином, запропонована модифікація методу виділення клітин є більш економічно вигідною та, можливо, з меншим негативним впливом на клітини. Такий метод дозволяв

ферментувати фрагменти тканини повністю та отримувати ГСПК для аналізу на проточному цитофлюориметрі.

З метою пошуку методів, які надалі можуть мати практичне значення, що передбачає використання лише декілька ферментів у низьких концентраціях при нетривалому часі інкубації, нами застосовано метод №2. Такий метод був використаний нами спочатку для виділення мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин [11, 12, 13, 14] і дозволяв отримувати фракцію клітин з нативної та кріоконсервованої плацентарної тканини, які утворювали колонії мезенхімальних стромальних клітин за умов культивування на адгезивному пластику *in vitro*. Подальше застосування такого методу виділення клітин для отримання ГСПК показало, що вміст ГСПК серед життєздатних CD45⁺ клітин плаценти достовірно не відрізнявся у порівнянні із методом №1. Таким чином результати нашої роботи показують можливість використання методів виділення №1 та №2 відповідно до поставлених задач (кількісні дані будуть наведені далі).

3.2. Дослідження впливу ферментативної обробки на результати аналізу проточної цитофлюориметрії ГСПК

Перед дослідженням імунофенотипу пуповинну кров було оброблено сумішшю ферментів відповідно до методу №1, що застосовувався для ферментації плацентарної тканини. Нам виявлено, що подібна ферментативна обробка в деяких випадках змінює експресію гемопоетичних маркерів на клітинах пуповинної крові, що аналізуються методом проточної цитофлюориметрії. Тому було досліджено ефект такої обробки. В більшості аналізів не спостерігалось достовірної різниці в рівні експресії маркерів, таких як CD7, CD33, CD14, CD19, CD34, CD45, CD235, CD45RA та їх різних комбінацій у порівнянні з клітинами пуповинної крові, що витримували в таких самих умовах однаково кількість часу, але без додавання ферментів. Однак вміст клітин з фенотипами CD7⁺CD45RA⁺ та CD45⁺CD45RA⁺ достовірно збільшувався в зразках пуповинної крові, що були оброблені ферментами (таб. 3.1.).

Таблиця 3.1.

Вплив ферментативної обробки на аналіз клітин пуповинної крові з певними фенотипами методом проточної цитофлюориметрії

Маркери	Рівень експресії маркера в пуповинній крові, %	Рівень експресії маркера в пуповинній крові після ферментативної обробки, %
CD7CD45RA	16,7 (10,4-24,3) *	25,2 (21,5-29,7) *
CD45CD45RA	40,4 (31,3-49,8) *	52 (44,7-59,1) *
CD33	12,6 (3,9-25,2)	19,6 (10,0-31,5)
CD34	0,9 (0,6-1,2)	1,1 (0,7-1,6)
CD14	10,2 (1,1-27,0)	17 (8,2-28,3)
CD19	19,5 (8,7-33,2)	16,2 (7,9-26,8)

Примітка. * – достовірна різниця, $n = 4$, $p \leq 0,05$. Наведені лише ті дані, для яких показана достовірна різниця, або тенденція до її наявності.

Також є дані, що інтенсивність експресії CD3, CD4, CD8, $\alpha\beta$ та $\gamma\delta$ Т-клітинного рецептора, що детектується методом проточної цитофлюориметрії, зменшується на 25 – 40 % на лімфоцитах периферичної крові, що інкубуються з колагеназою типу 1 А та диспазою [136].

Варто відзначити, що в проведеній нами роботі, на відміну від літературних даних, інтенсивність експресії підвищується при ферментативній обробці у порівнянні з контролем.

Таким чином, при порівнянні експресії маркерів методом проточної цитофлюориметрії у зразках, які оброблені та необроблені ферментами, варто враховувати, що отримана різниця може бути спричинена лише їхньою дією. Тому в

нашій роботі для порівняльного аналізу клітин пуповинної крові та плацентарної тканини фракція мононуклеарних клітин пуповинної крові також інкубувалась із ферментами перед проведенням проточної цитофлюориметрії, як було описано раніше (див. підрозділ 2.3.).

3.3. Підбір протоколу для імунофенотипування ГСПК тканини плаценти

Для визначення імунофенотипу фракції плацентарних мононуклеарних клітин та клітин пуповинної крові і фетальної печінки було обрано одноплатформений протокол ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering). Відомо декілька протоколів для визначення ГСПК, серед яких відомий протокол Milan/Mulhouse, що базується на підрахунку $CD34^+$ клітин з низьким параметром бічного світлорозсіювання (SSC) після гейтування живих клітин, що не містять дебрис, тромбоцити та еритроцити, а також клітинні агрегати [137, 138]. Однак нині більшість лабораторій пропонує використовувати стратегію гейтування ISHAGE. Такий протокол дозволяє детектувати $CD34^+$ клітини на проточному цитофлюориметрі одночасно за чотирма параметрами, а саме $CD45/CD34$ /бічне світлорозсіювання/пряме світлорозсіювання [139]. Важливо, що такий підхід дозволяє дискримінувати ГСПК від лімфоцитів та моноцитів та врахувати «справжні» $CD34^+$ клітини, які мають низьку експресію $CD45$ та низький параметр бічного світлорозсіювання ($CD45^{low}$, SSC^{low}) [140]. Фенотип $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$ є характерною особливістю попередників гемопоетичних клітин, які є «справжніми ГСПК» [141].

Алгоритм гейтування ГСПК плаценти зображено на рис. 3.1. Аналіз морфології життєздатних $CD45^+$ клітин показав присутність характерних для крові популяцій гранулоцитоподібних, лімфоцитоподібних та моноцитоподібних клітин (рис. 3.1, з, д).

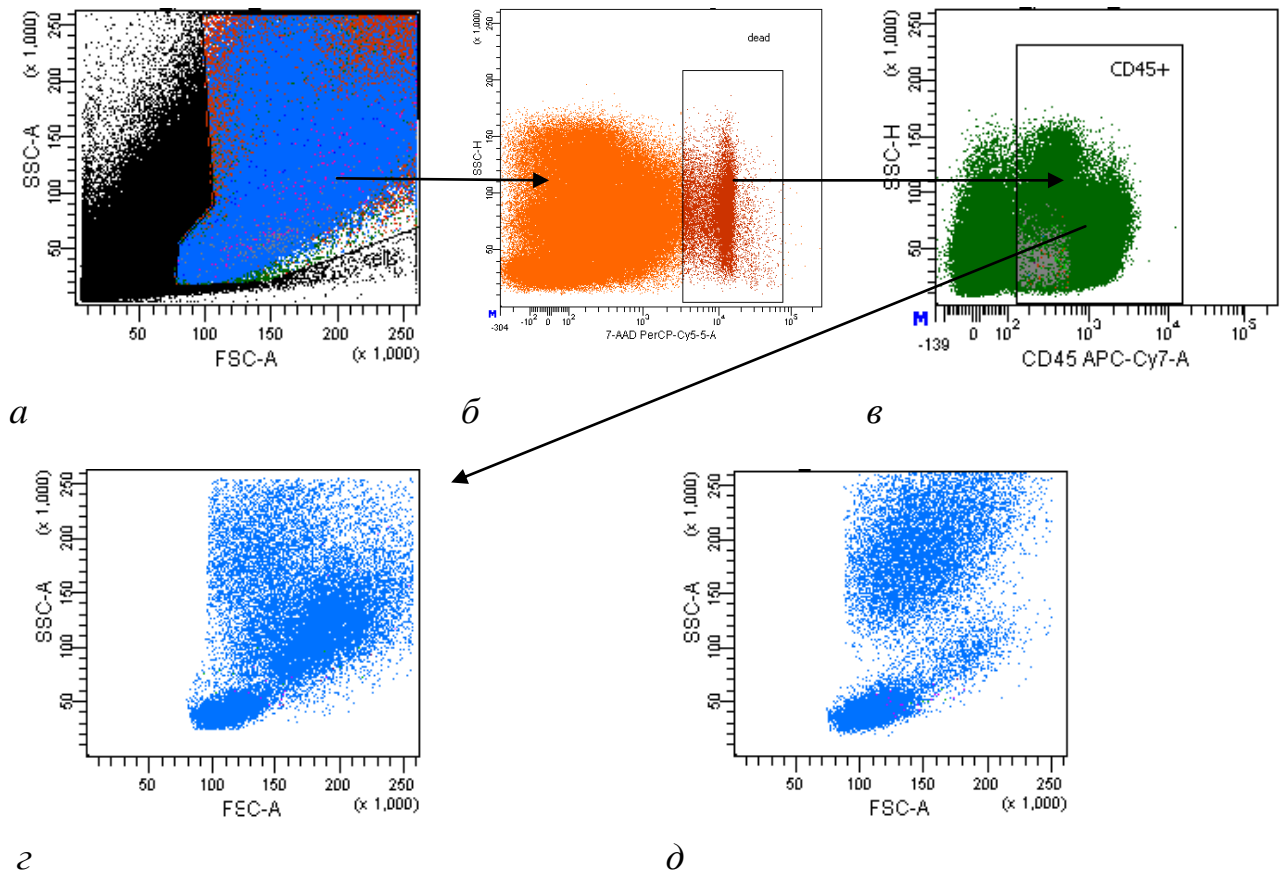


Рис. 3.1. Двовимірні гістограми послідовного імунофенотипування клітин нативної плаценти за протоколом ISHAGE: *а* – гейтування клітинної популяції шляхом виключення клітинного дебриса, еритроцитів, тромбоцитів та клітинних агрегатів; *б* – виключення нежиттєздатних $7AAD^+$ клітин; *в* – гейтування популяції $CD45^+$ клітин; *г* – розподілення популяції $CD45^+$ клітин за параметрами прямого (FSC) та бічного SSC світлорозсіювання; *д* – двовимірна гістограма FSC/SSC для $CD45^+$ клітин пуповинної крові, яка наведена для порівняння

Згідно обраної стратегії гейтування $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$ клітини було визначено серед усіх життєздатних $CD45^+$ клітин як ГСПК (рис. 3.2.).

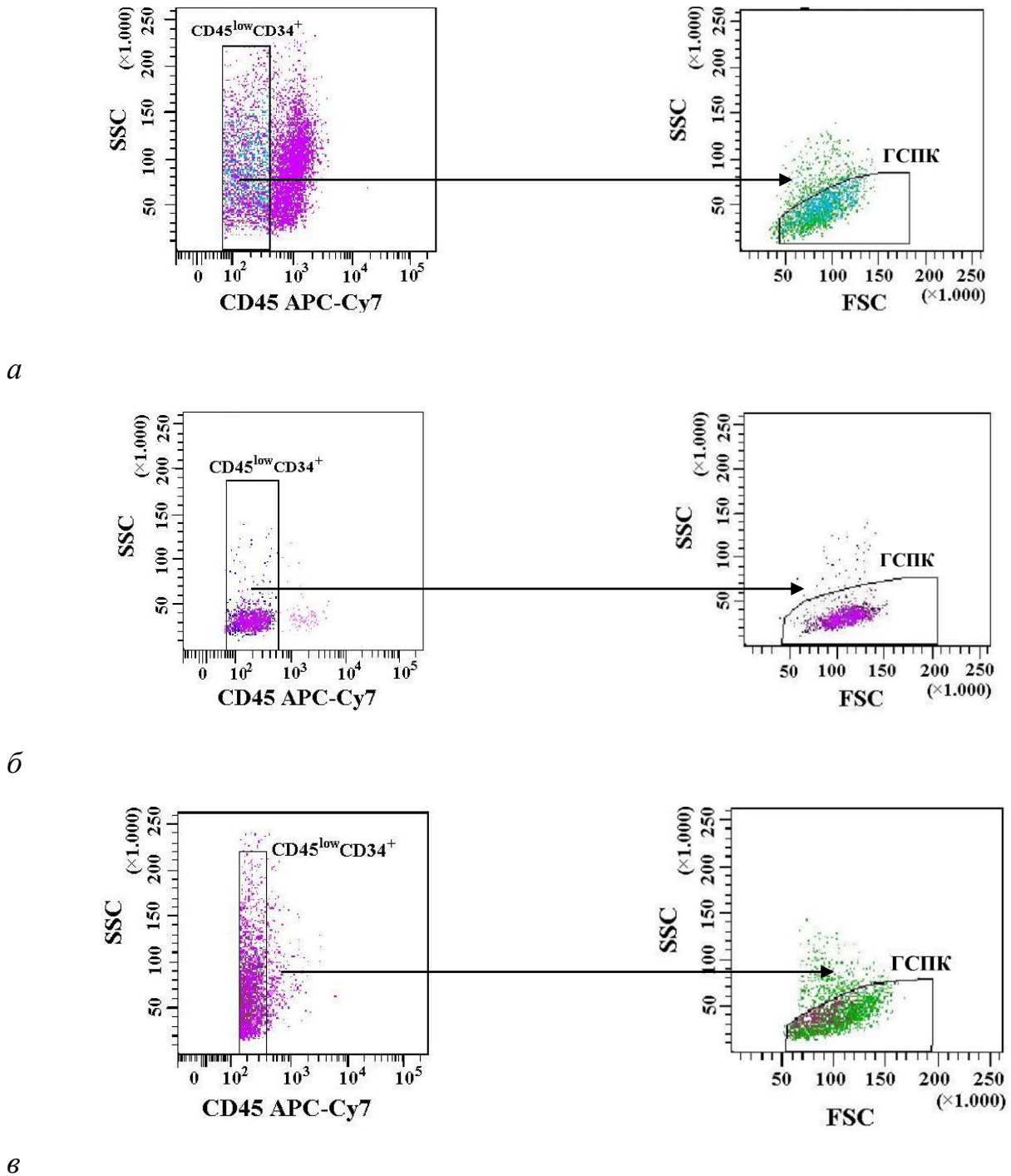


Рис. 3.2. Гістограми гейтування ГСПК ($CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$) за параметрами прямого (FSC) та бічного (SSC) світлорозсіювання із популяції $CD45^{low}CD34^+$ клітин нативної плаценти (*a*), нативної пуповинної крові (*б*) та кріоксервованої фетальної печінки (*в*)

Отримані нами дані щодо вмісту ГСПК в плацентарній тканині були ідентичними при використанні дещо спрощеного методу гейтування (рис.3.3.), який

використано для підтвердження результатів при відпрацюванні методу імунофенотипування та визначення кількості ГСПК плацентарної тканини.

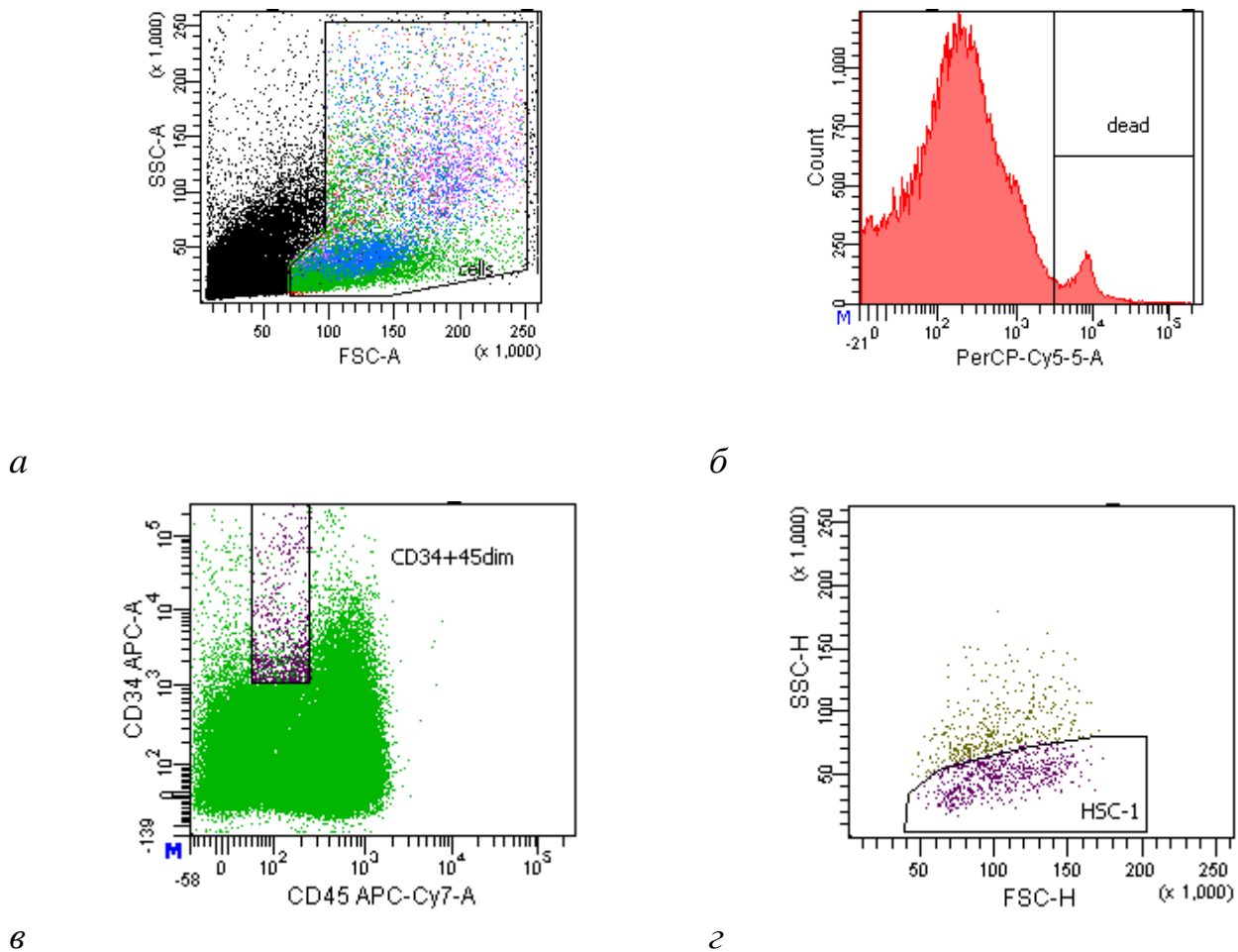


Рис. 3.3. Гістограми спрощеного послідовного імунофенотипування клітин нативної плаценти: *а* – гейтування клітинної популяції шляхом виключення клітинного дебриса, еритроцитів, тромбоцитів та клітинних агрегатів; *б* – виключення нежиттєздатних 7AAD⁺ клітин; *в* – гейтування популяції CD34⁺CD45^{low} клітин; *з* - гейтування ГСПК за параметрами прямого (FSC) та бічного (SSC) світлорозсіювання

Аналіз показав, що вміст ГСПК серед життєздатних CD45⁺ клітин нативної плацентарної тканини склав 0,56 % (0,39 – 0,76 %, n = 16) за методом виділення №1 та 1,14 % (0,29 – 2,55 %, n = 5) за методом виділення №2. Кількість ГСПК, які були виділені за методом №1 та №2, достовірно не відрізнялась. Вміст ГСПК серед

популяції $CD45^{low}CD34^{+}$ клітин складав 79,7 % (73,4 – 85,3 %, $n = 16$) для плацентарної тканини, 94,7 % (90,9 – 97,6 %, $n = 15$) для пуповинної крові та 78,9 % (58,6 – 93,6 %, $n = 6$) для фетальної печінки. Отже, кількість ГСПК серед $CD34^{+}CD45^{low}$ клітин в плацентарній тканині та фетальній печінці була практично однакова ($p < 0.05$), але достовірно нижча у порівнянні з пуповинною кров'ю ($p < 0.05$).

Загальний відсоток $CD34^{+}$ клітин у зрілій тканині плаценти ($CD45^{-}$ та $CD45^{+}$ включно) досягає 1,54 % (1,15 – 1,98 %, $n = 11$). Такий високий відсоток може пояснюватись присутністю ендотеліальних клітин у проаналізованій популяції, які також експресують $CD34^{+}$.

Таким чином, в даній роботі для кількісної оцінки ГСПК із тканини плаценти вперше використано ISHAGE протокол .

Низька експресія $CD45$ загалом характерна для всіх клітин-попередників в кістковому мозку: мієлобластів, монобластів, попередників В клітин та еритробластів [141, 142].

В наших дослідженнях майже всі $CD34^{+}$ клітини пуповинної крові та фетальної печінки експресували $CD45$ на низькому рівні. Однак в плацентарній тканині спостерігались субпопуляції з імунофенотипами $CD34^{+/low}CD45^{+}$ та $CD34^{++}CD45^{+}$, що не були відмічені раніше в роботах інших авторів. Більшість клітин в таких субпопуляціях експресували лінійні маркери, що дозволило нам віднести їх до пізніх прогеніторів.

Бокове світлорозсіювання також широко використовується при процедурі ідентифікації ГСПК [141, 171], однак у відомих на сьогоднішній день роботах при аналізі кількості ГСПК в плацентарній тканині етап гейтування по морфології не застосовувався [9, 16, 17].

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що для правильної оцінки кількості ГСПК методом проточної цитофлюориметрії, особливо для плацентарної тканини та тканини фетальної печінки, необхідно проводити гейтування за морфологією, оскільки вміст клітин SSC^{low} серед $CD34^{+}CD45^{low}$ складає біля 80%.

3.4. Порівняльний аналіз популяцій ГСПК плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки із різним рівнем експресії CD34 та CD45

Як зазначалось раніше, FACS аналіз життєздатних CD45⁺ клітин плацентарної тканини в координатах SSC/FSC показав, що плацентарні клітини мають морфологічні характеристики подібні до клітин пуповинної крові. Серед цих клітин спостерігали клітини з різною експресією CD34. За характером експресії CD34 серед CD34⁺CD45^{low} клітин можна виділити декілька субпопуляцій. Одним із методів гейтування може бути розподілення всіх клітин на дві основні популяції: з низьким рівнем експресії CD34^{low} та високим - CD34^{hi}. Зворотнє гейтування плацентарних CD34^{low} клітин на відмінну від пуповинної крові показало, що вони є морфологічно неоднорідною популяцією, і лише дуже незначна їхня кількість за параметрами FSC/SSC відповідає ГСПК (рис. 3.4.).

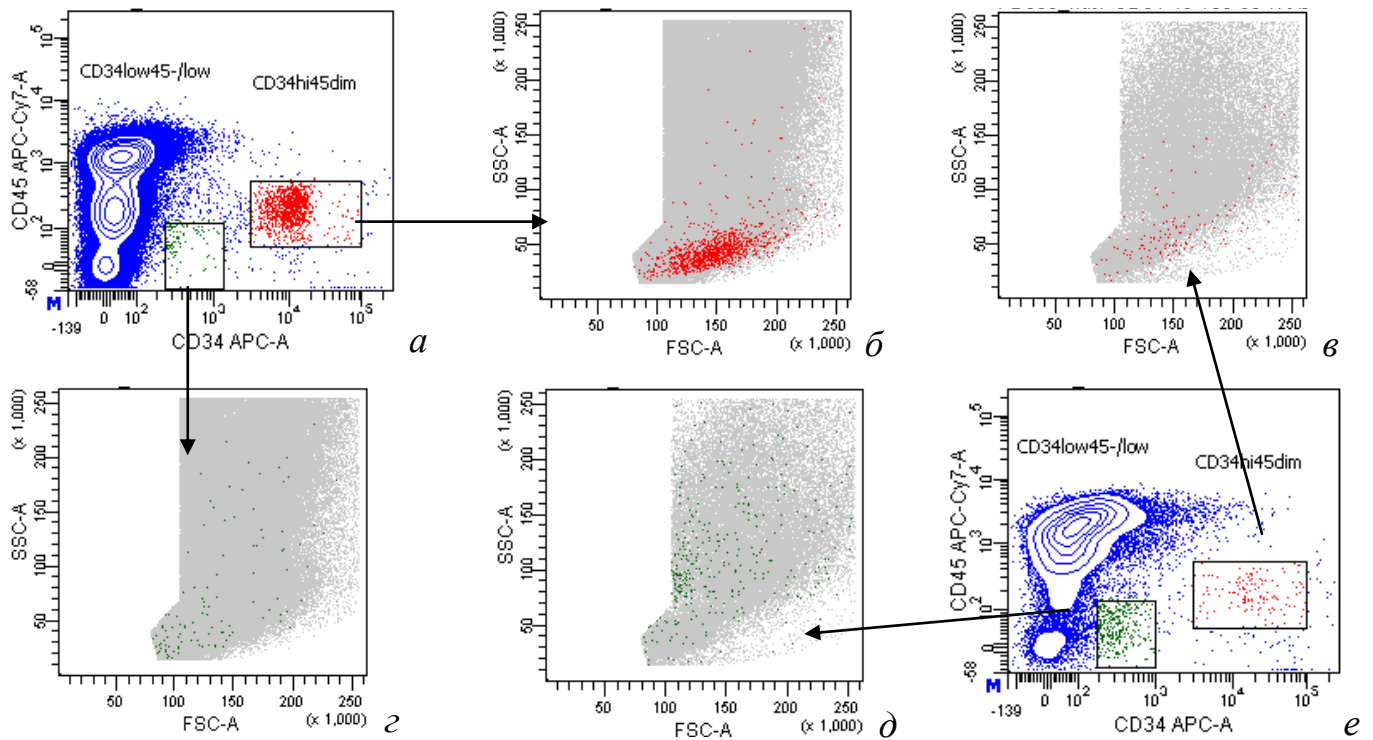


Рис. 3.4. Гістограми популяцій CD34^{low}CD45^{-/low} та CD34^{hi}CD45^{low} клітин пуповинної крові (а, б, с) та плаценти (в, д, е), їх розподілення за параметрами прямого (FSC) та бічного (SSC) світлорозсіювання

Шляхом зворотного гейтування цих двох популяцій в даній роботі показано, що популяція $CD34^{low}CD45^{-/low}$ клітин, на відміну від $CD34^{hi}CD45^{low}$, є морфологічно неоднорідною та містить невелику кількість клітин, що за своєю морфологією відповідають ГСПК. Потрібно відзначити, що наявність $CD34^{low}CD45^{-/low}$ клітин з високою гранулярністю цитоплазми може вказувати на ознаки диференціювання та апоптозу [143]. При культивуванні такі клітини утворювали невелику кількість еритроїдних та гранулоцито-моноцитарних колоній, що свідчить про їхню більш високу комітованість у порівнянні з $CD34^{hi}CD45^{low}$ клітинами [8]. Подібний спосіб гейтування, що включає розділення на дві основні популяції за експресією CD34, описаний у роботі [16], де виявляли $CD34^{+}CD45^{low}$ та $CD34^{++}CD45^{low}$ клітини. Загальна кількість $CD34^{++}CD45^{low}$ клітин збільшувалась із ростом плаценти, однак більша їх кількість в перерахунку на масу тканини спостерігалась на першому триместрі гестації. Обидві популяції клітин містили мультипотентні прогенітори, що здатні утворювати мієлоїдні та еритроїдні колонії.

Оскільки проводилось порівняння плацентарної популяції гемопоетичних клітин з такими пуповинної крові та фетальної печінки, то, як виявилось, доцільним було гейтування з виокремленням більш, ніж двох популяцій клітин, що дозволило краще охарактеризувати фенотипові особливості клітин. Так, показано, що зріла та фетальна плацентарна тканина містять три основні популяції з різним рівнем експресії CD34, які можна ідентифікувати як $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$ та $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ (рис. 3.5, *a, б*). Дві популяції $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ та $CD34^{++}CD45^{low/-}$ було виявлено також в пуповинній крові та фетальній печінці (рис. 3.5, *в, г*). Популяція $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ клітин була майже відсутня в пуповинній крові (рис. 3.5, *a - г*). На нашу думку, фетальна печінка також містить три такі популяції, що відповідають популяціям клітин в плацентарній тканині, однак із порівняно нижчою інтенсивністю експресії CD34 (рис. 3.5, *д*). Слід зазначити, що інші автори також виділяють у фетальній печінці три популяції із різним рівнем експресії CD34, а саме: $CD34^{+}$, $CD34^{++}$ та $CD34^{+++}$ [114].

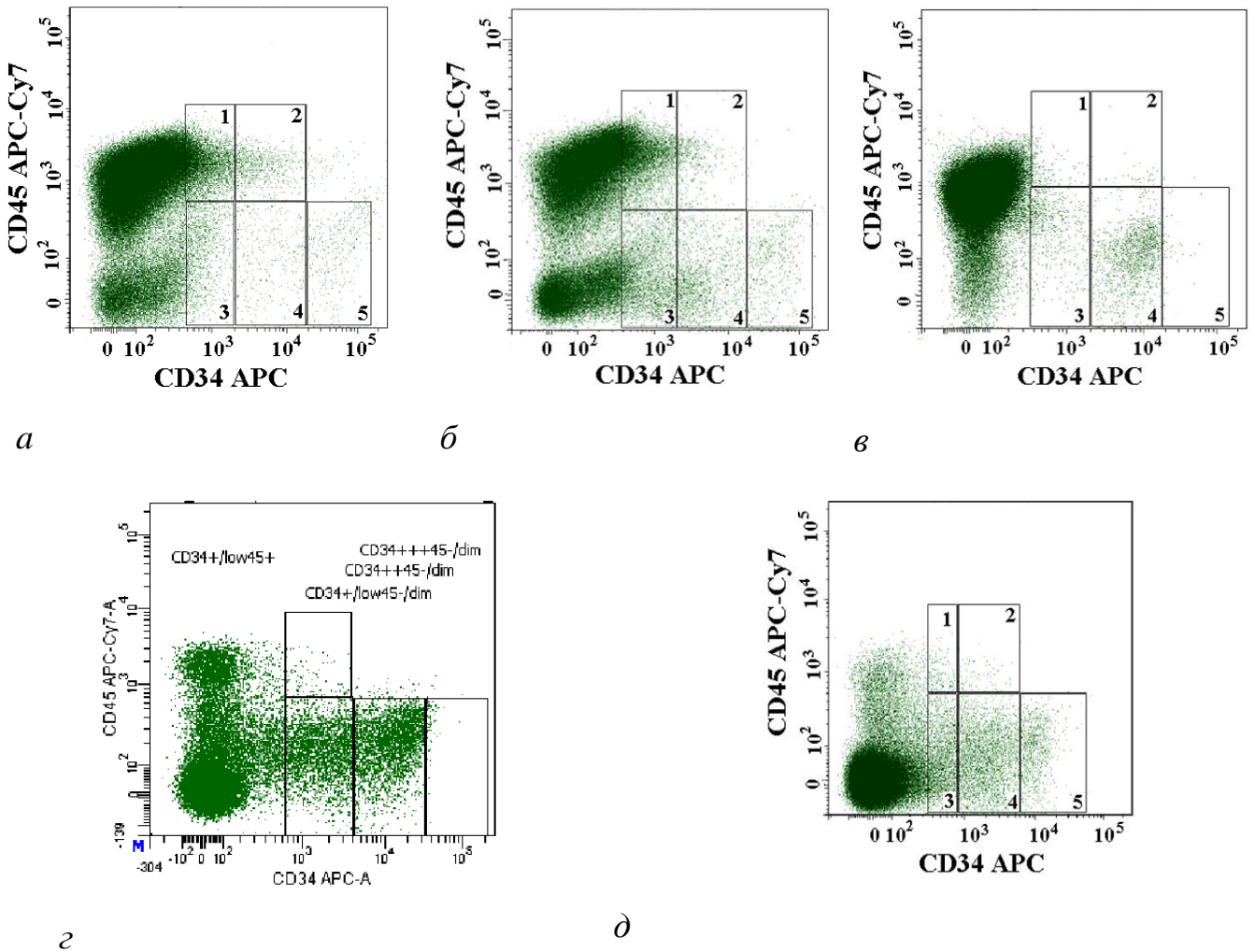


Рис. 3.5. Гістограми популяцій клітин з фенотипом $CD34^{+low}CD45^{+}$ (1), $CD34^{++}CD45^{+}$ (2), $CD34^{+low}CD45^{low/-}$ (3), $CD34^{++}CD45^{low/-}$ (4) та $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ (5) із тканини зрілої плаценти (а), тканини фетальної плаценти (б), пуповинної крові (в) та фетальної печінки (г, д)

Мультипараметричний цитофлюориметричний аналіз показав, що $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ клітини мають імунофенотип $CD33^{/low}CD14^{/low}CD235^{-}CD19^{-}CD7^{/low}CD45RA^{-}$ (рис. 3.6, а – е). Кількість клітин з фенотипами $CD34^{+++}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$ та $CD34^{+low}CD45^{low/-}$ серед усіх життєздатних клітин, що були виділені на фіколі із тканини зрілої плаценти, становила 0,37 % (0,16-0,66 %, n=6), 0,47 % (0,23-0,79 %, n=6), 0,97 % (0,36-1,88 %, n=6) відповідно. Клітини плацентарної тканини з фенотипом $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ загалом мали лімфоцитоподібну

морфологію ($FSC^{low}SSC^{low}$), тоді як $CD34^{+}CD45^{low/-}$ та $CD34^{+++}CD45^{low}$ клітини характеризувались гетерогенністю (рис. 3.6, $\epsilon - \zeta$).

На відміну від пуповинної крові та фетальної печінки в зрілій та фетальній плацентарній тканині були виявлені популяції $CD34^{+/low}CD45^{+}$ та $CD34^{++}CD45^{+}$ клітин (рис. 3.5, $a - \zeta$). Кількість клітин з такими фенотипами серед усіх життєздатних клітин, очищених на фіколі, становила 1,91 % (0,50-4,18 %, $n=6$) та 0,38 % (0,11-0,79 %, $n=6$) відповідно. Вони характеризувались вищим рівнем експресії лінійних маркерів у порівнянні з трьома популяціями $CD34$ -позитивних клітин із низьким рівнем експресії $CD45$. Аналіз морфології показав, що підвищення рівня експресії $CD45$ на $CD34$ -позитивних клітинах пов'язане із зростанням розмірів та гранулярності клітин (рис. 3.6, u, i).

Як вже припускалося нами раніше, фетальна печінка містить подібно до тканини плаценти $CD34^{++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+}CD45^{low/-}$ та $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ клітини. Відомо, що фетальна печінка містить клітини з високим рівнем експресії $CD34$, і така популяція збагачена клітинами, що мають фенотип $Thy-1^{+}$, $CD117^{+}$, $CD123^{+}$, $HLA-DR^{+}$, $CD7^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD71^{-}$, $CD115^{-}$ та здатні відновлювати гемопоез *in vivo* [105]. Фетальний кістковий мозок також містить популяцію клітин із різним рівнем експресії $CD34$ ($CD34^{hi}$ та $CD34^{lo}$), де лише $CD34^{hi}$ клітини мають імунофенотип найбільш примітивних гемопоетичних клітин: $Thy-1^{+}$, $HLA-DR^{low}$, $CD38^{low}$, $CD45RA^{-}$, а також експресують антигени $CD13$, $CD33$ на низькому рівні, та не мають поверхневих антигенів більш зрілих клітин ($CD2$, $CD10$, $CD14$, $CD15$, $CD16$, $CD19$, глікофорин). До того ж $CD34^{hi}$ клітини підтримували довготривалий В-лімфопоез та мієлопоез *in vitro* та утворювали Т-, В-, та мієлоїдні клітини при імплантації фрагментів фетальної людської кістки SCID мишам [68]. Така подібність до клітин фетальної печінки може свідчити про проходження активного гемопоезу в плацентарній тканині. З іншого боку, на відміну від фетальної печінки та пуповинної крові серед клітин плаценти присутні і більш зрілі ГСПК з фенотипом $CD34^{+/low}CD45^{+}$ та $CD34^{++}CD45^{+}$.

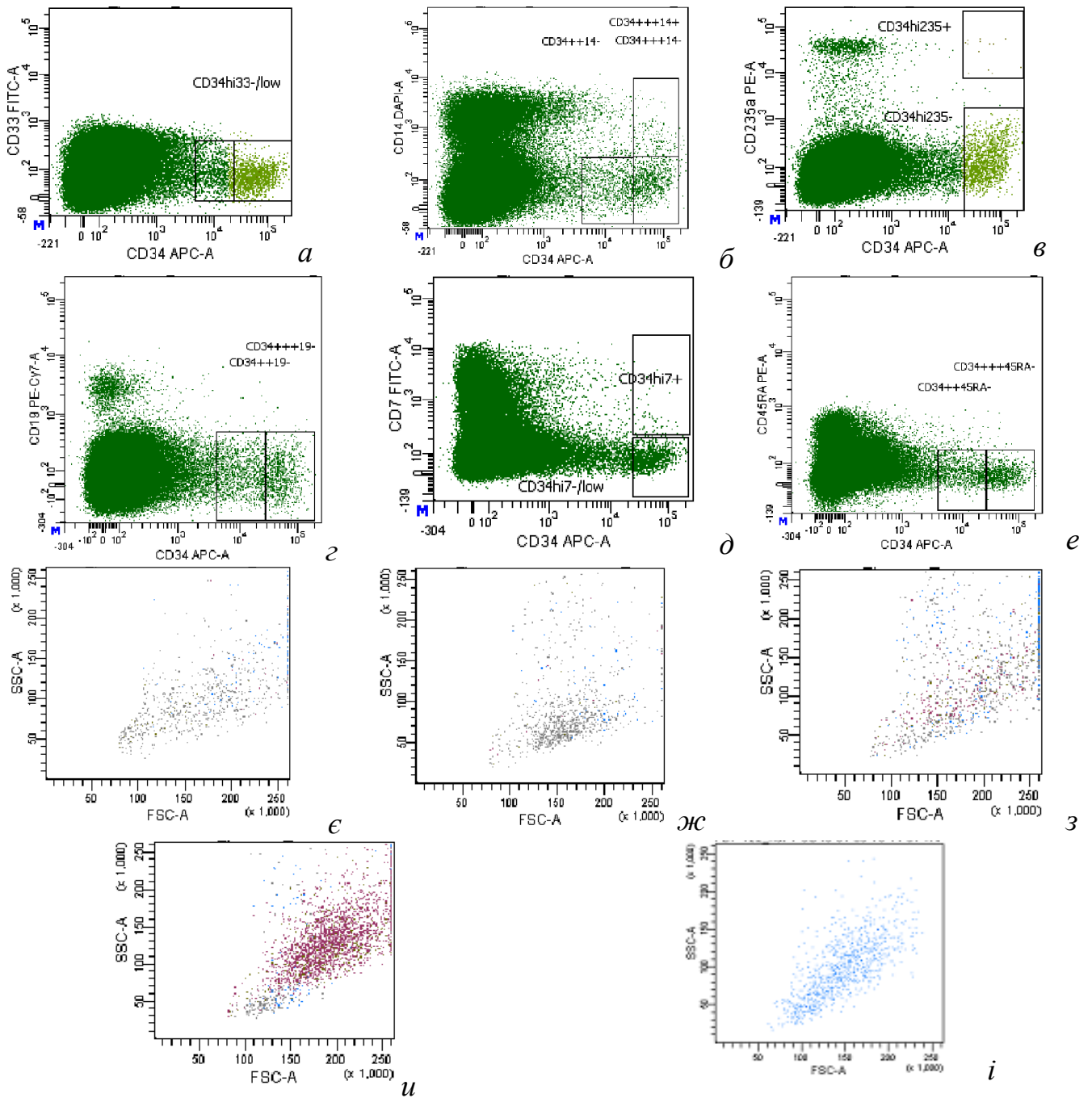


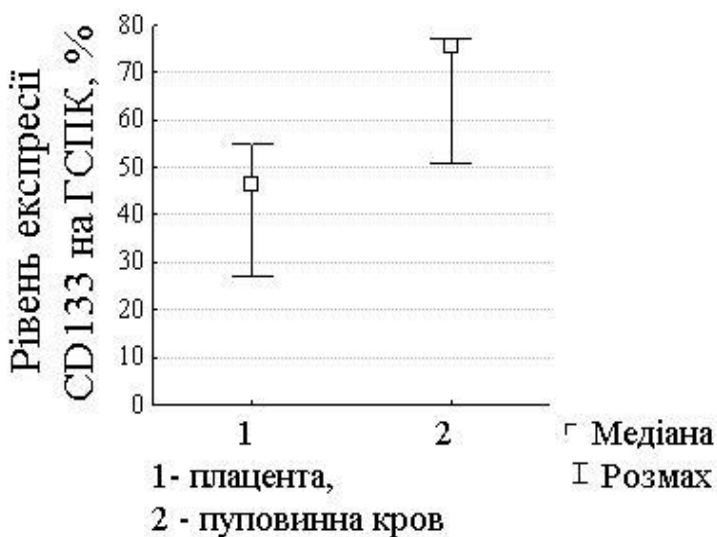
Рис. 3.6. Гістограми експресії CD34 та лінійних маркерів, таких як CD33 (а), CD14 (б), CD235 (в), CD19 (г), CD7 (д) та CD45RA (е) на клітинах плаценти. Гістограми FSC/SSC (морфологія клітин) для популяцій плацентарних клітин з фенотипами CD34⁺⁺⁺CD45^{low} (ж), CD34⁺⁺⁺CD45^{low} (з), CD34^{+/low}CD45^{low} (и), CD34^{+/low}CD45⁺ (у) та CD34⁺⁺⁺CD45⁺ (і)

Слід відзначити, що плацентарні гемопоетичні прогенітори більш гетерогенні за фенотипом, ніж такі клітини в пуповинній крові та фетальній печінці. Той факт, що в зрілій та фетальній плаценті виявляються прогеніторні клітини різних стадій

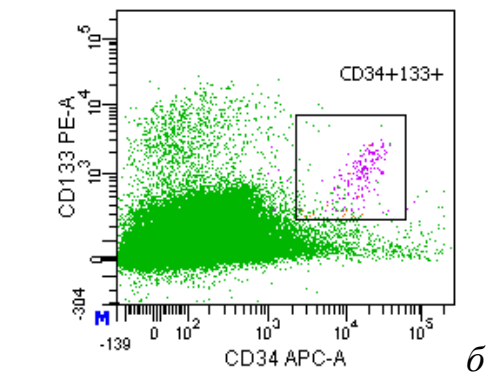
диференціювання, дозволяє припустити, що такі клітини продовжують утворюватись в плаценті і/або мігрувати в плацентарну тканину впродовж всього періоду гестації.

3.5. Порівняльне дослідження експресії CD133, CD90 та CD31 в ГСПК плаценти та пуповинної крові

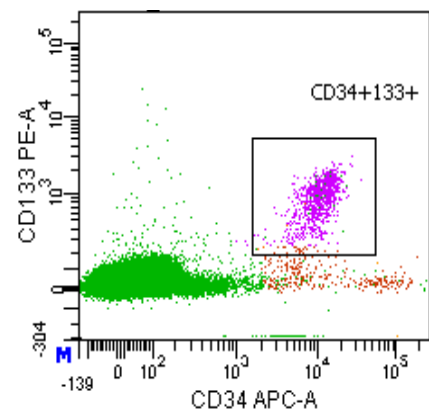
Плацентарні ГСПК експресують CD133 так само, як і ГСПК пуповинної крові (рис. 3.7, *a*). Варто відзначити, що, як в плаценті, так і в пуповинній крові, експресія CD133 спостерігалась не у всіх популяціях клітин із різним рівнем експресії CD34, а лише в популяції CD34⁺⁺CD45^{low/-} клітин (рис. 3.7, *b*, *в*).



a



b



в

Рис. 3.7. Характер експресії CD133 на CD34-позитивних клітинах із плаценти та пуповинної крові. *a* – різниця в характері експресії CD133 на ГСПК зрілої плацентарної тканини ($n = 4$) та кордової крові ($n = 4$), $p < 0.05$. Гістограми експресії CD34 та CD133 на клітинах плацентарної тканини (*b*) та пуповинної крові (*в*)

ГСПК пуповинної крові та плацентарної тканини, а саме $CD34^{++}CD45^{low/-}$ клітини, експресували CD133, що також було відзначено іншими авторами [8]. Відомо, що більшість клоногенних клітин міститься в $CD34^{+}CD133^{+}$ фракції клітин [28]. Такий факт свідчить про примітивність досліджуваної нами популяції клітин з фенотипом $CD34^{++}CD45^{low/-}$, що також підтверджувалось відсутністю експресії лінійних маркерів, а саме CD33, CD235, CD19, CD7 та CD45RA. Однак частина $CD34^{++}CD45^{low/-}$ клітин експресувала CD14. Оскільки $CD34^{++}CD45^{low/-}$ клітини здебільшого мали лімфоцито-подібну морфологію, що є властивістю прогеніторних та стовбурових клітин, їх також можна віднести до ранніх прогеніторів.

Дослідник Varsena та співавтори знаходили дві популяції $CD34^{++}CD45^{low}$ та $CD34^{+}CD45^{low}$ в ворсинках хоріона та хоріон-амніотичній мембрані на різних стадіях плацентарного розвитку. Як повідомлялося в їхній роботі, $CD34^{++}CD45^{low}$ клітини експресують маркери мультипотентних примітивних гемопоетичних прогеніторів та гемопоетичних стовбурових клітин та демонструють мієлоїдний та еритроїдний потенціал *in vitro*, генерують $CD56^{+}$ НК-клітини та $CD19^{+}CD20^{+}sIgM^{+}$ В-клітини; в той час як $CD34^{+}CD45^{low}$ популяція містить більш комітовані прогенітори [16]. Слід також відзначити, що, на відміну від пуповинної крові, плацентарна тканина має більшу популяцію $CD34^{-}CD133^{+}$. Припускалося, що $CD34^{-}CD133^{+}$ клітини представлені більш ранніми попередниками, ніж $CD34^{+}CD133^{+}$ [92].

Таким чином, зріла плацентарна тканина подібно до фетальної печінки та пуповинної крові містить примітивні ГСПК з фенотипом $CD133^{+}CD34^{++}CD45^{low}$.

Нами показано, що зріла та фетальна плацента, на відміну від пуповинної крові, характеризувалися присутністю $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ клітин, які подібно до $CD34^{++}CD45^{low/-}$ не експресували лінійні маркери, однак, крім того ж, вони не несли CD133 та мали гетерогенну морфологію. Можливо, такі клітини генеруються в плацентарній тканині або мігрують з інших сайтів гемопоезу, змінюються та набувають властивого їм імунотипу під впливом плацентарного мікрооточення. Варто припустити, що популяція плацентарних ГСПК, які характеризуються дуже високим рівнем експресії білка міжклітинної адгезії CD34, має здатність взаємодіяти із плацентарною клітинною нішею.

Із даних літератури відомо, що CD34⁺⁺⁺ гемопоетичні прогеніторні клітини пуповинної крові людини мають високий проліферативний потенціал [144].

В наших дослідженнях вперше показано, що ГСПК плацентарної тканини мають достовірно вищий рівень експресії CD90 у порівнянні з ГСПК пуповинної крові (рис. 3.8).

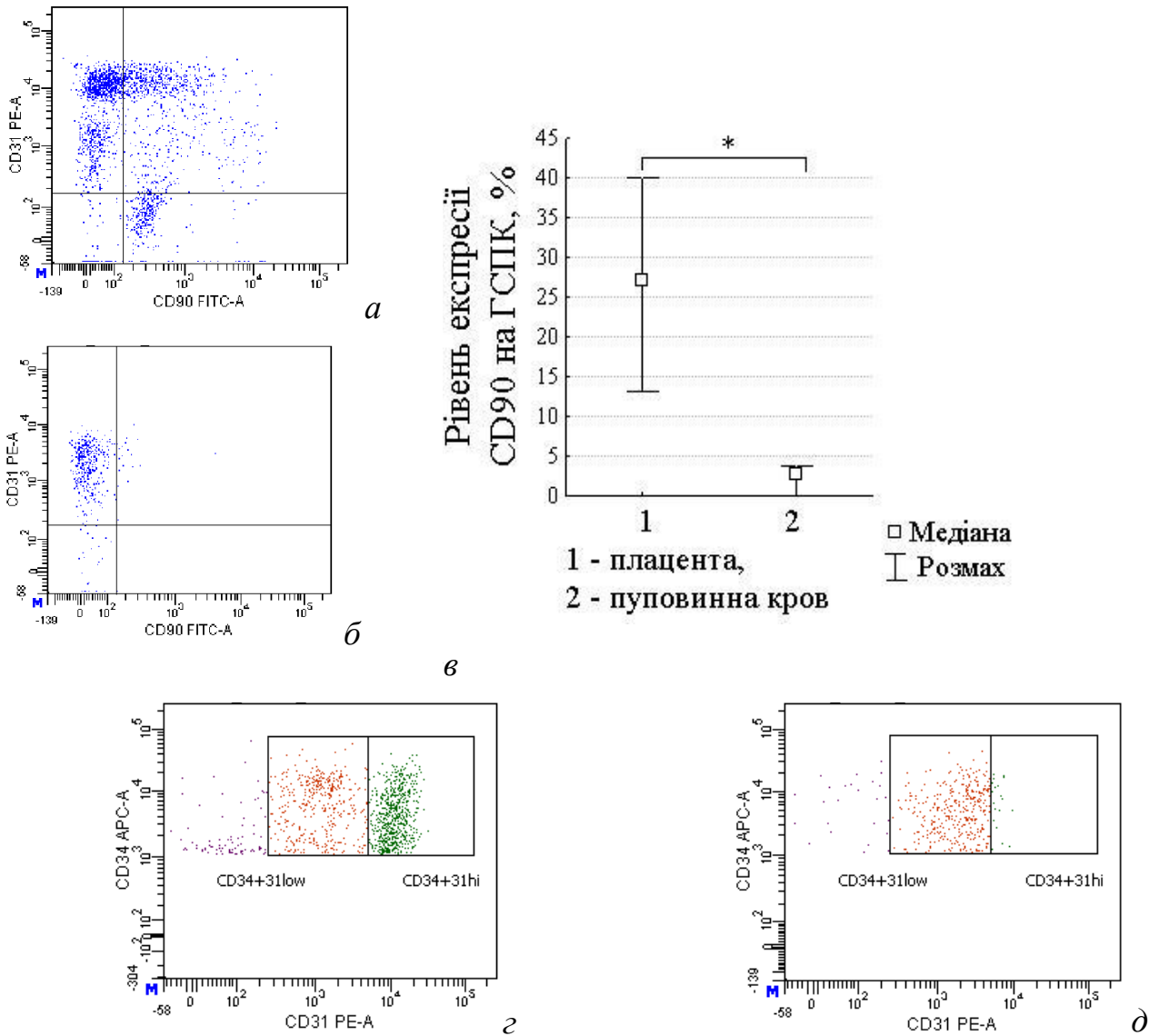


Рис. 3.8. Гістограми експресії CD90 та CD31 на ГСПК зрілої плацентарної тканини (а) та пуповинної крові (б); в – рівень експресії CD90 на ГСПК плацентарної тканини (n=4) та пуповинної крові (n=5), * – достовірна різниця, p<0.05. Гістограми експресії CD31 та CD34 на ГСПК плацентарної тканини (г) та пуповинної крові (д)

ГСПК плаценти та пуповинної крові також експресували CD31 (рис. 3.8. а, б) на високому рівні, а саме: для зразків плаценти відсоток CD31⁺ клітин серед CD34⁺CD45^{low} популяції становив 76 %, 92 % та 94 %, для пуповинної крові – 86 % та 99 %. Плацентарні ГСПК містили дві популяції з різною інтенсивністю експресії CD31, такі, як CD34⁺CD45^{low}CD31^{hi} та CD34⁺CD45^{low}CD31^{low}, в той же час в пуповинній крові містились лише CD34⁺CD45^{low}CD31^{low} клітини (рис. 3.8. з, д). Більш того, спостерігалась коекспресія CD90 на CD31⁺CD34⁺CD45^{low} клітинах (рис. 3.8. а, б). CD31⁺CD90⁺ популяція серед ГСПК становила 67 % та 57 % для плаценти та 82 % для пуповинної крові. CD31⁺CD90⁻ клітини серед ГСПК були виявлені на рівні 24 % та 37 % для плаценти та 3 % для пуповинної крові. В плацентарній тканині серед ГСПК, на відміну від пуповинної крові, виявляли популяцію CD31⁻CD90⁺ клітин у кількості 3 % та 6 %. ГСПК, що не несли CD31 та CD90 маркери, спостерігались лише у кількості 5 % та 3 % у випадку плаценти та 14 % - у випадку пуповинної крові.

Тож ГСПК плацентарної тканини експресували CD90 та CD31, що також було показано раніше [16], однак літературні дані стосувалися клітин на першому та другому триместрі гестації. Нами вперше було показано, що зріла плацентарна тканина у порівнянні з пуповинною кров'ю містить достовірно більшу кількість ГСПК, які експресують CD90, що може свідчити про різну функціональну активність таких популяцій клітин. Повідомлялося, що CD34⁺CD90⁺ популяція переважно представлена CD34⁺CD90⁺CD38^{low} клітинами, які належать до ранне-комітованих ГСПК [3]. Тож різний рівень експресії CD90 може свідчити про більш високий вміст ранне-комітованих ГСПК в плацентарній тканині порівняно з пуповинною кров'ю. Функція CD31 на ГСПК ще недостатньо вивчена, однак відомо, що такий білок забезпечує взаємодію із стромальними клітинами ніші та задіяний в трансендотеліальній міграції [145]. Також повідомляється, що додавання антитіл проти CD31 до клітин пуповинної крові в культурі призводило до значного підвищення кількості BFU-E та CFU-GM, що свідчить про роль CD31 в процесах диференціації [146]. Той факт, що плацентарна тканина містить CD34⁺CD45^{low}CD31^{hi} та CD34⁺CD45^{low}CD31^{low} популяції, на відміну від пуповинної

крові, ймовірно, свідчить про те, що циркулюючі ГСПК пуповинної крові не мають потреби у високій інтенсивності експресії білку CD31 на відміну від клітин, що містяться в плацентарній тканині та взаємодіють з їх нішею.

3.6. Порівняльний аналіз комітованих популяцій ГПК плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки

Виходячи із поставлених задач, в роботі було проаналізовано експресію лінійних маркерів, таких як CD33, CD14, CD235, CD19, CD7, CD45RA на всіх популяціях гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) зрілої і фетальної плацентарної тканини та пуповинної крові.

Встановлено, що в пуповинній крові, плацентарній тканині та фетальній печінці присутня значна кількість незрілих ГСПК, що не експресували жодних з проаналізованих лінійних маркерів ($CD34^+CD45^{low}Lin^-SSC^{low}$). Вміст лінійно-комітованих клітин серед ГПК зрілої плаценти достовірно вищий, ніж серед відповідних клітин пуповинної крові, однак нижчий порівняно з фетальною печінкою. До того ж, сумарний вміст лімфоїдних прогеніторів достовірно більший серед ГПК у фетальній печінці, ніж у пуповинній крові та плацентарній тканині. Загальний вміст усіх проаналізованих мієлоїдних та еритроїдних прогеніторів серед ГПК більше в плацентарній тканині по відношенню до таких клітин пуповинної крові, та більше серед ГПК в фетальній печінці порівняно з пуповинною кров'ю та плацентарною тканиною (таб. 3.2.).

Експресію CD33 на ГПК досліджено багатьма авторами та встановлено, що клітини, які експресують одночасно $CD34^+CD33^+$, відносяться до мієлоїдних прогеніторів [105], а саме – до ранніх [132]. До того ж при культивуванні $CD34^+CD13^+CD33^+$ клітини кісткового мозку утворюють колонії переважно мієлоїдного походження [22].

Таблиця 3.2.

Загальний вміст некомітованих та комітованих ГПК серед ГПК в зрілій плаценті, пуповинній крові та фетальній печінці

Клітини Джерело	Зріла плацентарна тканина	Пуповинна кров	Фетальна печінка
№	1	2	3
Некомітовані в еритроїдному та мієлоїдному напрямку прогенітори (CD34 ⁺ CD45 ^{low} SSC ^{low} CD33 ⁻ CD14 ⁻ CD235 ⁻)	47.8 % (29.1 – 66.9 %) n=5	90.3 % (78.3 – 97.8 %) n = 5	36.2 % (21.4 – 52.5 %) n = 4
	1-2*, 2-3*, p<0,05		
Лімфоїдні прогенітори	6.9 % (0.9 – 18.1 %) n = 6	3.9 % (1.8 – 6.3 %) n = 6	50.9 % (39.6 – 62.0 %) n = 7
	1-3*, 2-3*, p<0,05		
Мієлоїдні та еритроїдні прогенітори	19.8 % (8.9 – 33.8 %) n = 6	7.9 % (1.5 – 18.6 %) n = 6	52.5 % (30.2 – 74.3 %) n = 6
	1-2*, 2-3*, 1-3*, p<0,05		

Отримані нами дані показали, що зріла плацентарна тканина, як і пуповинна кров, містить популяцію раних мієлоїдних попередників з фенотипом CD34⁺CD45^{low}CD33⁺SSC^{low} (рис.3.9, а, б, г), а в фетальній плацентарній тканині 8 тижня гестації популяція CD34⁺CD45^{low}CD33⁺SSC^{low} клітин складає 1,7 % серед усіх ГПК (рис.3.9, е).

В роботі [147] також наведені дані про те, що плацентарна тканина містить проангіогенні незрілі мієлоїдні клітини. Varsena та ін. показали наявність субпопуляцій $CD34^{++}CD45^{low}$ та $CD34^{+}CD45^{low}$, що експресували CD13, CD33 та CD44 на 12 тижні гестації плаценти. При цьому більшість $CD34^{+}$ клітин експресували CD13, і 5-30 % $CD34^{+}$ клітин експресували CD33, але найбільш незрілі популяції $CD34^{++}CD45^{low}$ клітин мали низький рівень експресії цього антигену [8].

При дослідженні ГПК фетальної печінки встановлено, що вміст $CD34^{+}CD45^{low}CD33^{+}SSC^{low}$ прогеніторів в ній достовірно вищий, ніж в пуповинній крові та плацентарній тканині (рис.3.9, в, з). Більшість лінійно-комітованих клітин в популяції ГПК пуповинної крові представлено клітинами з фенотипом $CD34^{+}CD45^{low}CD33^{+}SSC^{low}$, що також відмічалось і в інших роботах [52, 87].

Дослідження експресії CD13 та CD33 на фетальних прогеніторах, проведені іншими авторами, показали, що такі антигени експресуються фетальними стовбуровими клітинами на відміну від дорослих стовбурових клітин [105].

В зрілій плацентарній тканині нами виявлено субпопуляцію більш зрілих мієлоїдних попередників з фенотипом $CD34^{+}CD45^{low}CD14^{+}SSC^{low}$, але така субпопуляція відсутня в пуповинній крові (рис. 3.9. а, б, д).

Субпопуляцію $CD34^{+}$ клітин, яка коекспресує CD14 в пуповинній крові, раніше не знаходили [52], проте були і такі роботи, в яких показували, що $CD34^{+}$ клітини пуповинної крові можуть експресувати пізні маркери: CD14 та CD15 [148], хоча їхня частка зовсім незначна [87]. В кістковому мозку $CD34^{+}$ клітини не експресують такі маркери зрілих клітин, як CD3, CD11b, CD14, CD20 [149].

Ми показали, що 7,2 % ГПК в фетальній плаценті 8 тижня гестації мають фенотип $CD34^{+}CD45^{low}CD14^{+}SSC^{low}$ (рис.3.9, е). Вміст прогеніторів цього фенотипу у фетальній печінці не відрізнявся від такого в плацентарній тканині, однак був вищим, ніж у пуповинній крові (рис.3.9, е).

У зрілій плацентарній тканині та фетальній печінці не всі $CD34^{+}CD45^{low}CD14^{+}SSC^{low}$ клітини експресують CD33 (рис.3.9, а, б, в). До того ж, в пуповинній крові популяція $CD34^{+}CD45^{low}CD33^{+}CD14^{+}SSC^{low}$ відсутня (рис.3.9, ж).

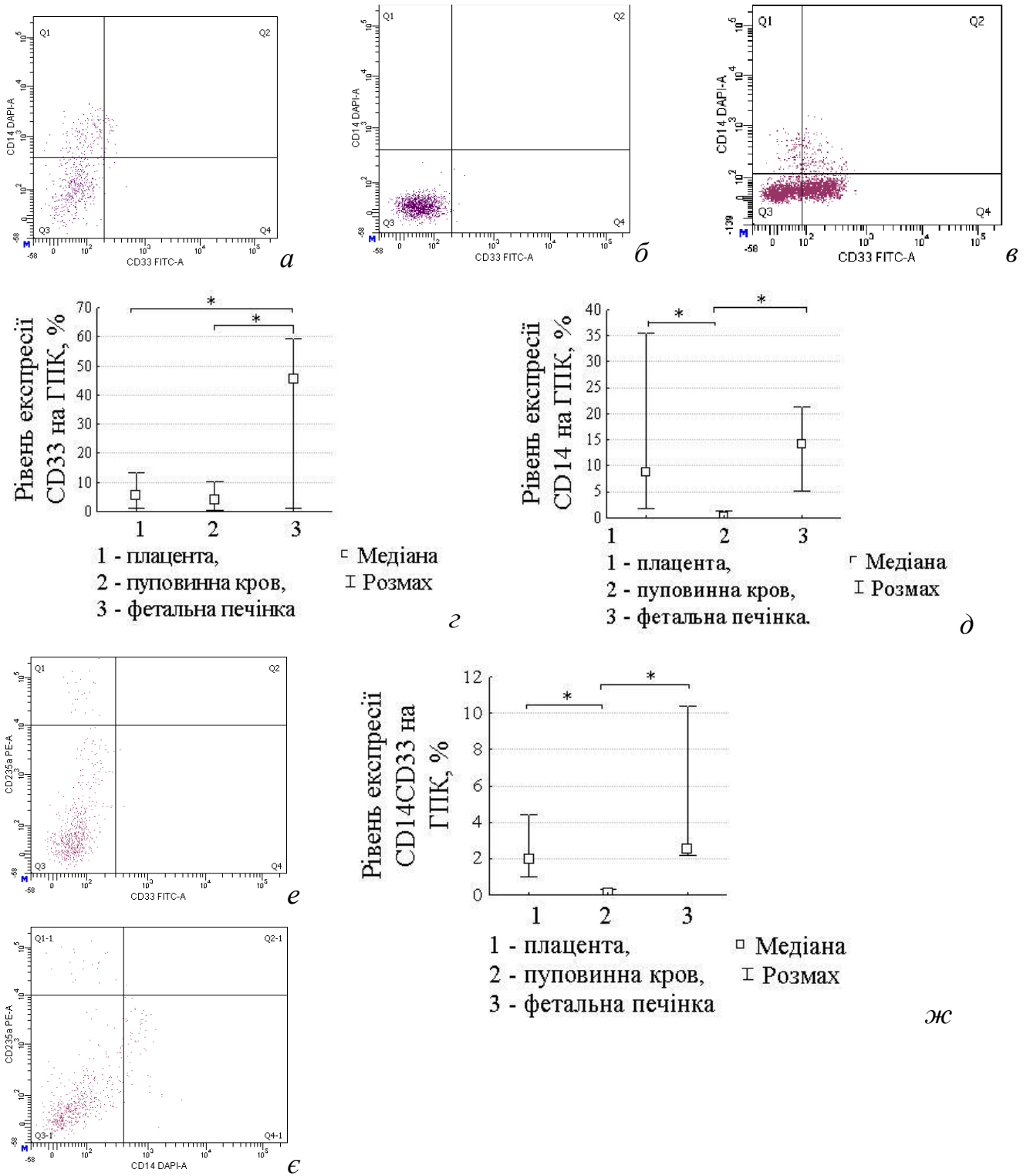


Рис. 3.9. Гістограми експресії CD33, CD14 на ГПК зрілої плацентарної тканини (а), пуповинної крові (б) та фетальної печінки (в). Рівень експресії CD33 (з), CD14 (д) та CD33 із CD14 (ж) на ГПК зрілої плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки. Гістограми експресії CD33 та CD235 (е) і CD14 та CD235 (є) на ГПК фетальної плаценти 8 тижня гестації, * - $p < 0.05$ (плацента) $n = 6$, (пуповинна кров) $n = 6$, (фетальна печінка) $n = 3-7$

Рівень експресії маркера CD14 на клітинах, які отримані із зрілої плацентарної тканини, імунофенотипів $CD34^{+++}CD45^{low}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$ та $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ становив 5,2 % (2,3 – 9,4 %, n = 6), 9,8 % (3,5 – 18,9 %, n = 4) та 10,9% (4,8 – 19,1 %, n = 6) відповідно на відміну від популяцій пуповинної крові, де CD14 взагалі не виявлявся. Експресія CD14 підвищувалась разом із зниженням CD34 на $CD45^{low/-}$ клітинах плацентарної тканини. Більш того, коекспресія CD14 та CD33 підвищувалась на $CD34^{+}$ клітинах разом із підвищенням рівня експресії CD45 при зниженні експресії CD34 (рис.3.10, a – e).

Слід відзначити, що субпопуляція $CD34^{++}CD45^{low}$ є найбільш незрілою, оскільки експресує CD133 та негативна за CD33, CD235, CD19, CD7 і CD45RA.

Подібна залежність також була встановлена іншими авторами, які показали, що зростання експресії CD14 на $CD13^{+}CD33^{+}$ клітинах корелювало з втратою маркера CD34 на клітинах із тканини хоріона 12 тижня гестації, що свідчило про наявність субпопуляції зрілих міелоїдних $CD14^{+}$ клітин. Такі клітини є спеціалізованими резидентними макрофагами, та присутні в хоріональній тканині, починаючи з 4 тижня гестації до утворення зрілої плаценти і являють собою першу зрілу і найпоширенішу популяцію лейкоцитів в плаценті [16].

Крім того, нами показано, що в зрілій плацентарній тканині деяка частина $CD14^{+}$ клітин має фенотип прогеніторних клітин, а отже, є пізніми міелоїдними прогеніторами.

Таким чином, як в пуповинній крові, так і в плаценті, більшість із комітованих прогеніторів, є міелоїдними, однак в плаценті вони більш диференційовані, ніж в пуповинній крові.

Інші автори, що вивчали гемопоез на першому триместрі вагітності в плаценті людини, а саме в хоріональній пластині та ворсинках, виявляли макрофагальні прогенітори навіть до моменту, коли наставала фетоплацентарна циркуляція. Висунуто припущення, що макрофагальні клітини-попередники або утворювались *de novo* в плаценті, або мігрували туди як прогенітори крізь позазародкову мезодерму [60].

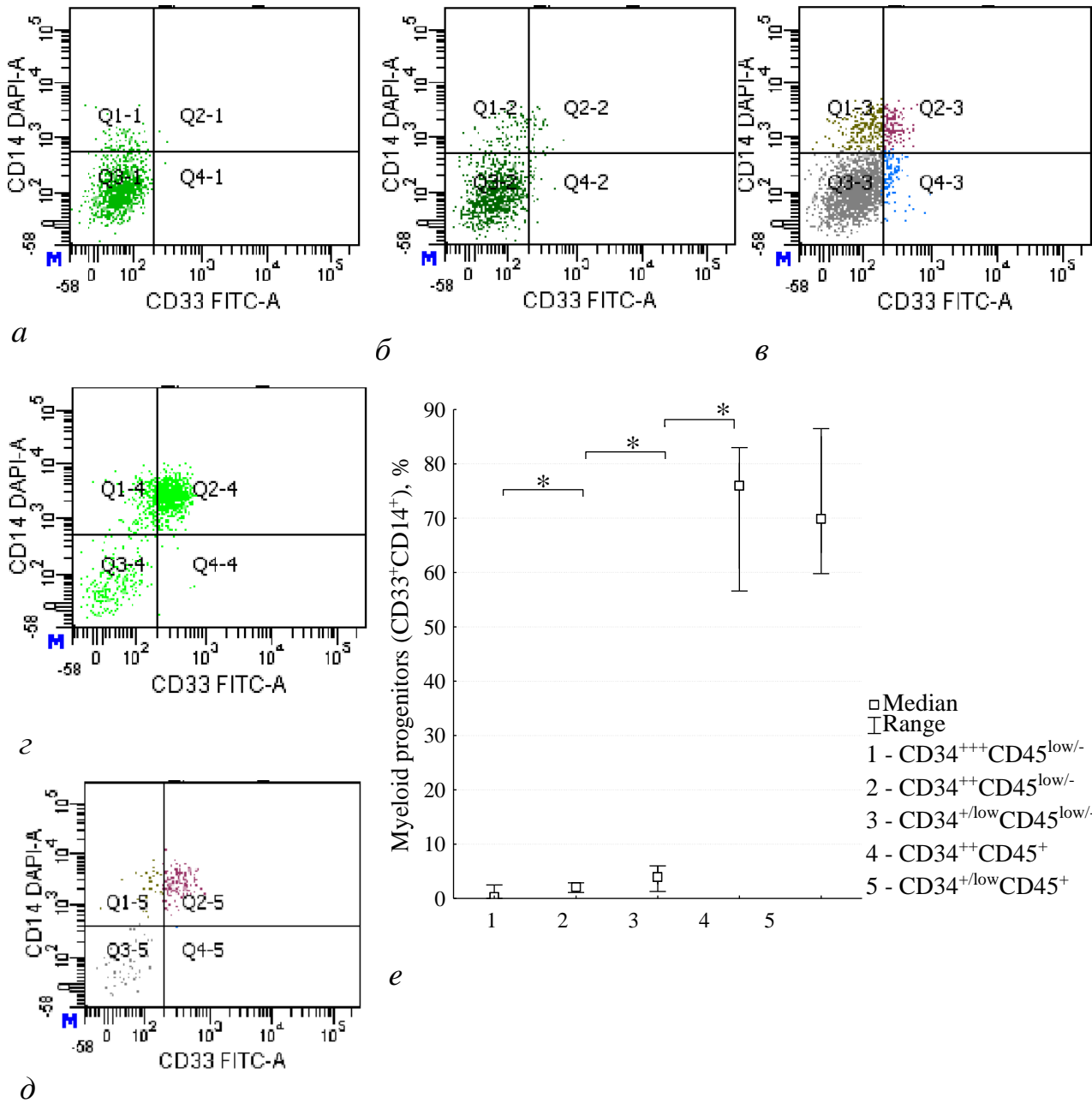


Рис.3.10. Гістограми вмісту CD33⁺CD14⁺ серед популяцій клітин із фенотипом CD34⁺⁺⁺CD45^{+/low} (а), CD34⁺⁺CD45^{+/low} (б), CD34^{+/low}CD45^{+/low} (в), CD34⁺⁺CD45⁺ (г) та CD34^{+/low}CD45⁺ (д) із зрілої плацентарної тканини. е – вміст CD33⁺CD14⁺ клітин серед різних популяцій ГПК в плацентарній тканині: CD34⁺⁺⁺CD45^{+/low}, CD34⁺⁺CD45^{+/low}, CD34^{+/low}CD45^{+/low}, CD34^{+/low}CD45⁺ та CD34⁺⁺CD45⁺, * - p<0.05, n = 6

В наших дослідженнях показано, що такі прогенітори залишаються і в зрілій плаценті. Загалом, в плаценті вміст та гетерогенність міелоїдних прогеніторів серед ГПК вищий, ніж в пуповинній крові. Відмінністю та особливістю плацентарних

ГПК, як в зрілій, так і в фетальній плаценті, є наявність значної кількості пізніх міелоїдних прогеніторів із фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$.

Нами встановлено, що порівняно з пуповинною кров'ю серед ГПК зрілої плацентарної тканини так само, як і серед таких клітин фетальної печінки, міститься достовірно більша кількість еритроїдних прогеніторів з фенотипом $CD34^+CD45^{low}CD235^+SSC^{low}$ (рис.3.11, *a – d*). Така популяція спостерігалась також у фетальній плаценті (рис.3.9, *e*).

Відомо, що серед $CD235^+$ примітивних ембріональних еритроїдних клітин 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 [59].

В нашій роботі було виявлено, що у фетальній плаценті 8 тижня гестації вміст еритроїдних клітин-попередників ($CD34^+CD45^{low}CD235^+SSC^{low}$) в популяції ГПК складав 10,9 %.

Інші автори також показали, що в плацентарній тканині, але на 21 тижні гестації, $CD34^+CD45^{low}$ клітини експресують $CD71$ та $EpoR$. При цьому більшість з них не експресують $CD235$ (автори відносять такі клітини до ранніх еритроїдних прогеніторів), також присутні клітини $CD235^+$ із різним рівнем експресії $CD34$ (проміжні еритроїдні попередники пізніх стадій комітування) [16]. Як показано раніше, кінцеве дозрівання та енуклеація ранніх еритробластів людини проходять на першому триместрі вагітності в плацентарних ворсинках [60].

Нами встановлено, що еритропоез продовжується до кінцевого терміну вагітності. Тканина зрілої плаценти, пуповинна кров та фетальна печінка містили міело-еритроїдні прогенітори: ГПК, які коекспресували $CD235$ та $CD14$ (рис. 3.11, *e – ж*).

Відомо, що еритроїдна та міелоїдна лінії диференціювання мають спільні клітини-попередники. Так, $CD133^+$ клітини кісткового мозку при культивуванні утворюють клітини, що коекспресують $CD13$ та $CD36$ і мають здатність до диференціювання в еритроїдному та міелоїдному напрямках в залежності від наявності відповідних факторів росту [150].

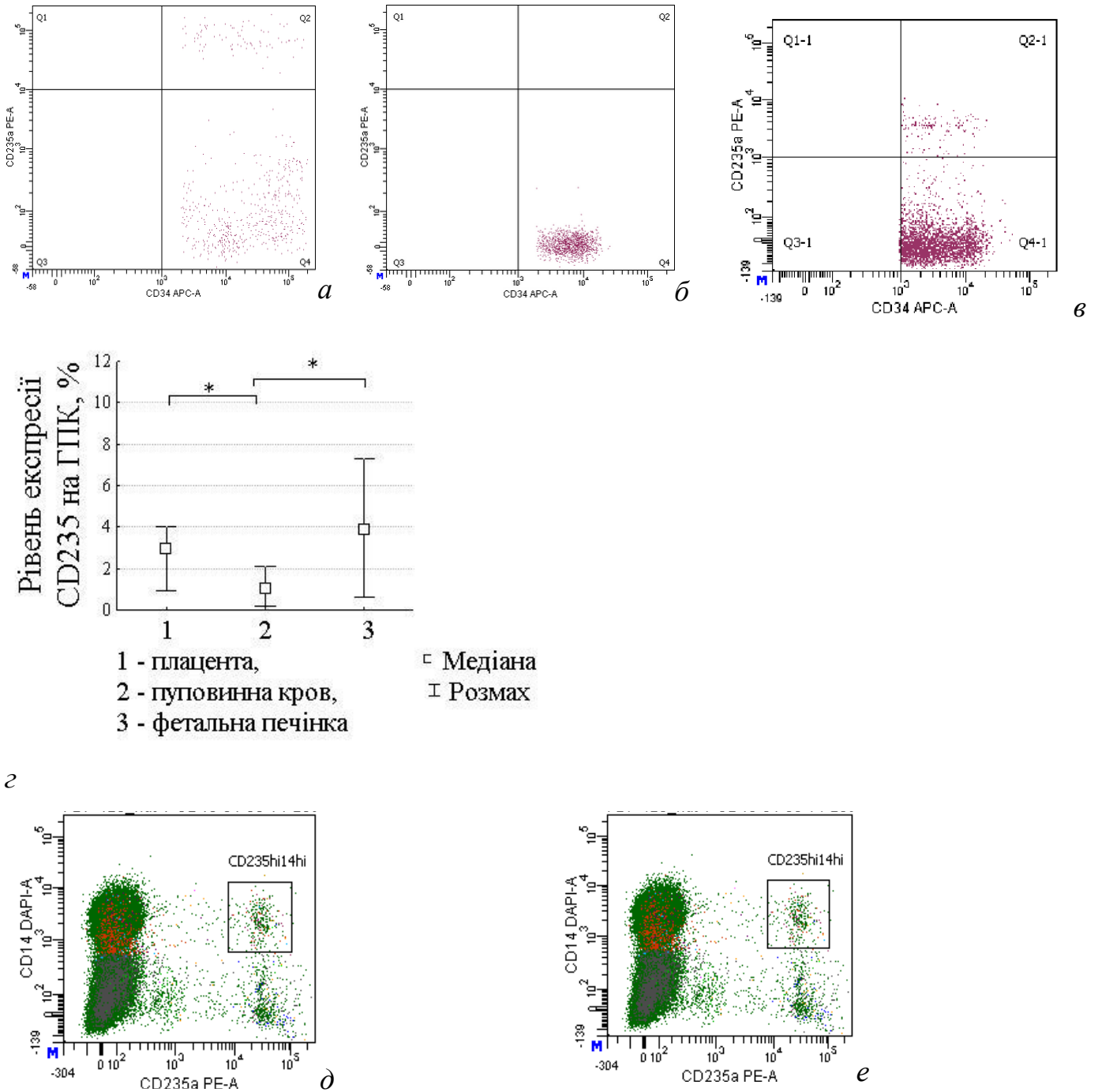


Рис.3.11. Гістограми експресії CD235 та CD34 на ГПК плацентарної тканини (а), пуповинної крові (б) та фетальної печінки (в). з – різниця експресії CD235 на ГПК плацентарної тканини, пуповинної крові та фетальної печінки, * - $p < 0.05$ (плацента) $n = 6$, (пуповинна кров) $n = 6$, (фетальна печінка) $n = 7$. Гістограми експресії CD235 та CD14 на клітинах плацентарної тканини (д), пуповинної крові (е)

Зріла плацентарна тканина, як і пуповинна кров, містила Т-лімфоїдні прогенітори та/або NK-прогенітори з фенотипом $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}CD7^+$. При

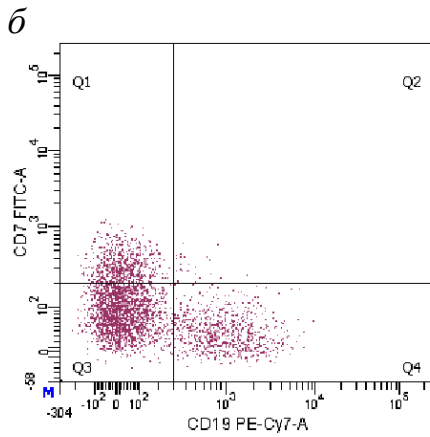
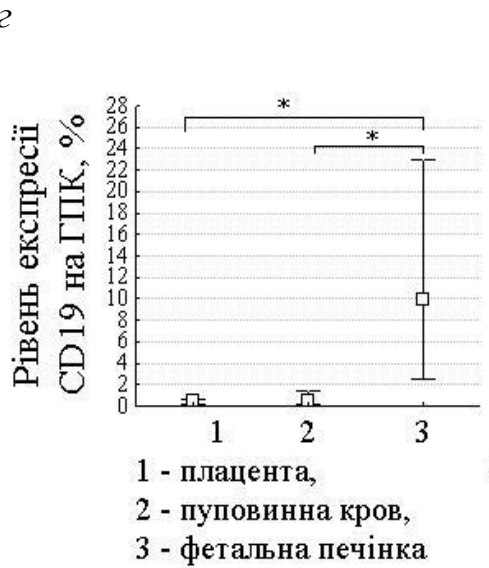
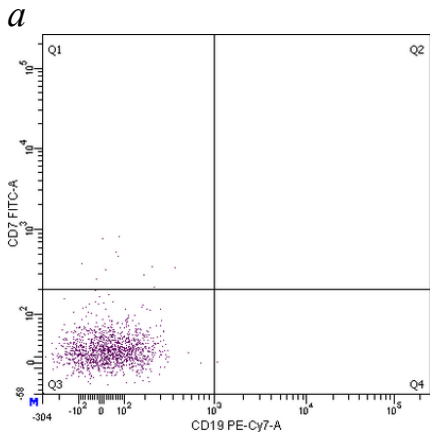
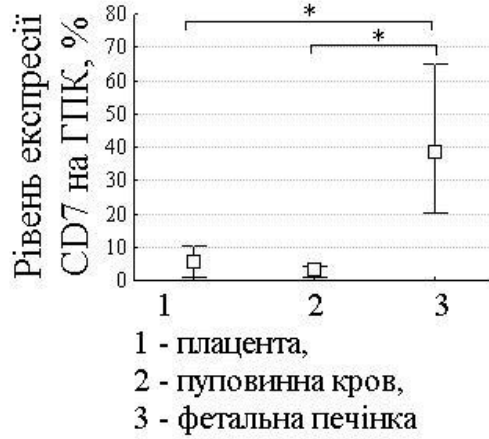
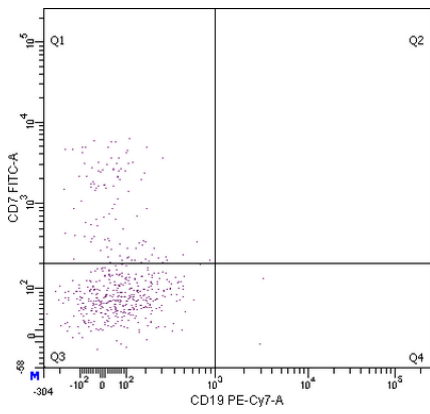
дослідженні вмісту клітин із імунотипом $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}CD7^+$ в деяких зразках кількість таких прогеніторів серед ГПК в зрілій плацентарній тканині була в 10 разів вищою, ніж у пуповинній крові. Однак при обрахунку усіх результатів досліджень нами не отримано достовірної різниці, що може бути пов'язано з відносно малою вибіркою із шести зразків, які були взяті в аналіз. Фетальна печінка характеризувалась достовірно вищим вмістом таких Т-лімфоїдних прогеніторів та/або НК-прогеніторів у порівнянні з плацентарною тканиною та пуповинною кров'ю (рис.3.12, *a – z*).

Як відомо, комітовані лімфоїдні прогенітори з фенотипом $CD34^+CD7^+$ заселяють тимус [151]. В деяких роботах в пуповинній крові на $CD34^+$ клітинах не спостерігали коекспресію таких лінійних маркерів, як CD7, CD10 та CD19 методом проточної цитофлюориметрії, однак виявляли її методом cDNA-PCR [52]. Однак в інших роботах показано коекспресію CD34 та CD7 на клітинах пуповинної крові, кісткового мозку та мобілізованої периферичної крові [51].

Серед фракції плацентарних клітин, виділених на фіколі, нами виявлено 27,1 % (14,6 – 41,8 %) $CD7^+CD45^+$ клітин, та 10,1 % (5,9 – 15,2 %) $CD7^+CD45RA^+CD45^+$ клітин.

Слід відзначити, що в іншій роботі серед $CD45^+$ клітин із плаценти автори не виявили Т-лімфоцитів та спостерігали дуже мало НК-клітин на 22 – 39.5 тижні гестації [16].

В наших дослідженнях у зрілій плацентарній тканині виявлено Т-лімфоїдні прогенітори та/або НК-прогенітори з фенотипом $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}CD7^+$. Також ми спостерігали зрілі Т-лімфоцити на різних стадіях дозрівання з фенотипами $CD7^+CD45^+$ та $CD7^+CD45RA^+CD45^+$ відповідно. Однак такі клітини можуть бути НК-клітинами оскільки, в роботах деяких авторів показано, що вони також експресують CD7 [152] та CD45RA [153].



д

в

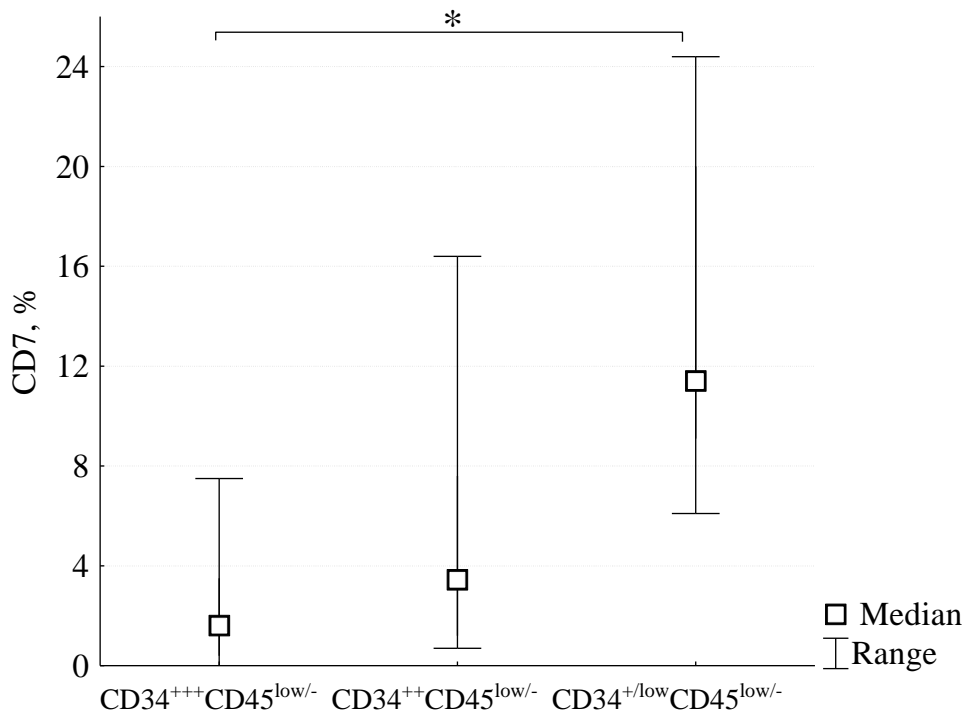
Рис.3.12. Гістограми експресії CD7 та CD19 на ГПК плацентарної тканини (а), пуповинної крові (б) та фетальної печінки (в). Рівень експресії CD7 (д) та CD19 (е) на ГПК плацентарної тканини, пуповинної крові та фетальної печінки, * - $p < 0.05$ (плацента) $n = 6$, (пуповинна кров) $n = 6$, (фетальна печінка) $n = 7$

При дослідженні вмісту комітованих прогеніторів в зрілій плаценті та пуповинній крові ми також спостерігали незначну кількість В-лімфоїдних

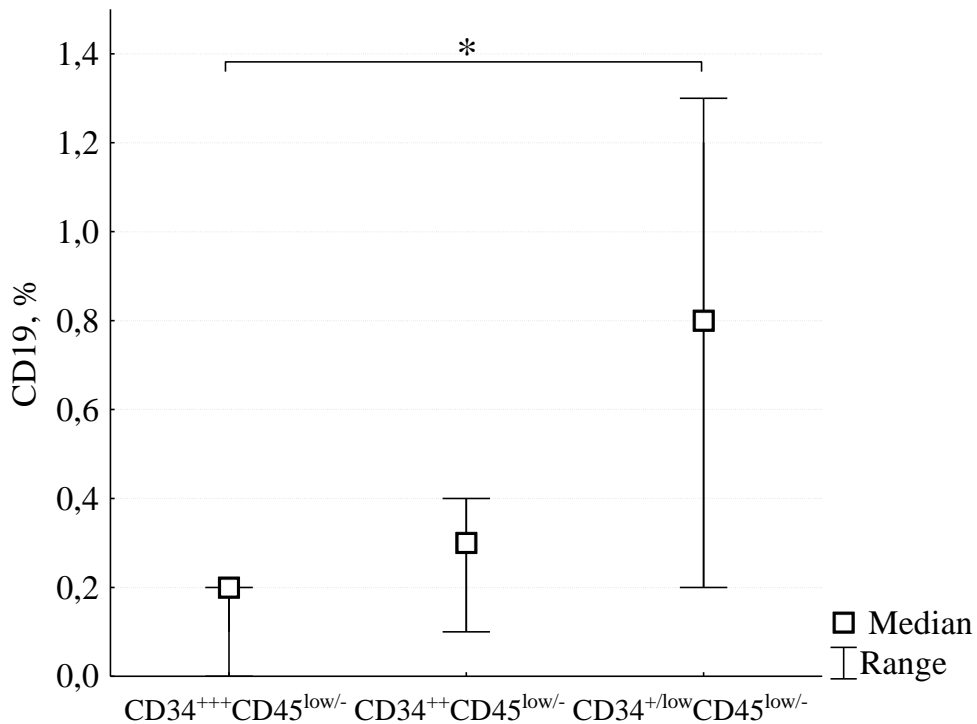
прогеніторів з фенотипом $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}CD19^+$ на відміну від фетальної печінки, де їхній вміст серед популяції ГПК був достовірно вищим (рис.3.12, а – в, д). За даними літератури, $CD34^+CD19^+$ клітини, які мають низьку експресію FLT3 відносяться до примітивних попередників В-клітин [81]. При порівнянні таких джерел ГПК, як кістковий мозок, пуповинна та периферична кров, найбільша кількість В-лімфоїдних прогеніторів з фенотипом $CD34^+CD19^+$ було знайдено в кістковому мозку [51, 154, 23]. Дослідження інших авторів показали, що на 12-19 тижнях гестації $CD34^{++}CD45^{low}$ клітини фетального хоріону при культивуванні в спеціальному середовищі для лімфоїдних клітин утворювали незначну кількість $CD19$ клітин, хоча слід відзначити, що автори не виявляли експресії В-лімфоїдних маркерів на клітинах *in situ*.

Нами показано, що подібно до $CD14$ та $CD33$ експресія $CD7$ та $CD19$ зростає із зниженням рівня експресії $CD34$ на $CD45^{low/-}$ клітинах зрілої плаценти а також пуповиної крові. Так, рівень експресії $CD7$ був достовірно вищим для субпопуляції клітин із імунофенотипом $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ у порівнянні із клітинами, що несли імунофенотип $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ (рис.3.13, а). Більш високий рівень експресії $CD19$ спостерігався також для субпопуляції $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ (рис.3.13, б).

Оскільки експресія лінійних маркерів, таких як $CD14$, $CD33$, $CD7$ та $CD19$, на ГПК підвищувалась разом із зменшенням експресії $CD34$ можна стверджувати, що це вказує на різний ступінь диференціювання $CD34^{+++}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$ та $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ клітин. Такі спостереження підтверджуються роботами, що показали наявність примітивних гемопоетичних прогеніторів, в тому числі стовбурових клітин, серед клітин з високим рівнем експресії $CD34$; тобто примітивність прогеніторних клітин пов'язана із високим рівнем експресії $CD34$ [80, 68, 105, 22, 18]. Відомо, що в дорослому кістковому мозку експресія $CD34$ зменшується одночасно із підвищенням експресії $CD38$ [21]. Більшість таких клітин експресує гемопоетичні лінійні маркери, що, ймовірно, дозволяє віднести їх до більш пізніх клітин-попередників.



a

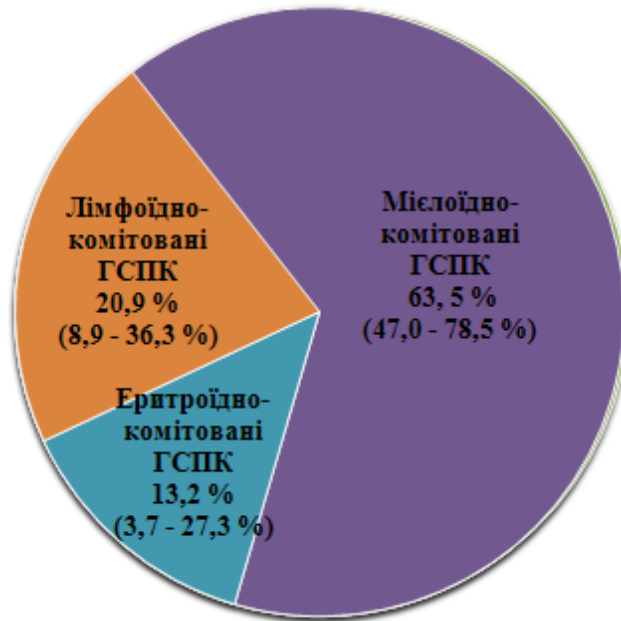


б

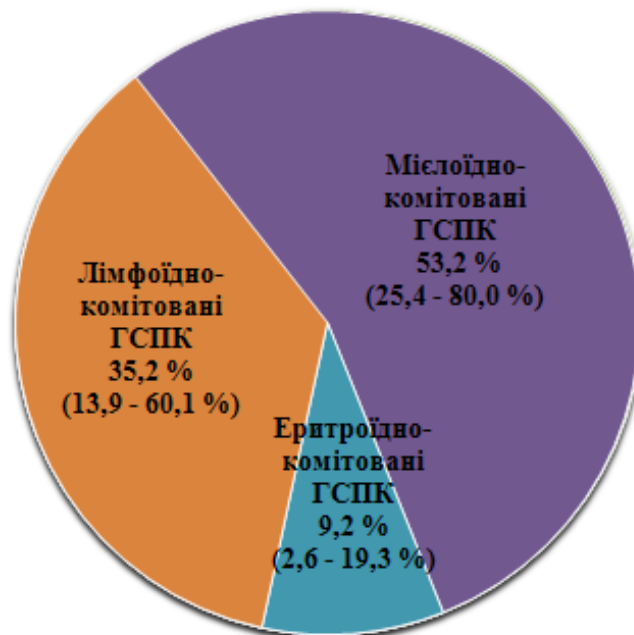
Рис.3.13. Діаграми рівней експресії CD7 (а) та CD19 (б) на різних популяціях ГПК: CD34⁺⁺⁺CD45^{low/-}, CD34⁺⁺CD45^{low/-}, CD34^{+low}CD45^{low/-}, * – p < 0.05, n = 6

Порівняння даних по відносному вмісту мієлоїдних, еритроїдних та

лімфоїдних комітованих клітин серед усіх комітованих ГПК в зрілій плацентарній тканині та пуповинній крові не показало достовірної різниці (рис.3.14.).



a



б

Рис. 3.14. Відносний вміст міелоїдних, еритроїдних та лімфоїдних комітованих клітин серед усіх комітованих ГПК в зрілій плацентарній тканині (*a*) та пуповинній крові (*б*), $p < 0.05$, $n = 6$

3.7. Спосіб виділення гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти та їх характеристика

Проведені нами раніше дослідження показали, що із замороженої тканини плаценти можна виділити функціонально активні мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), які за своїми властивостями не відрізнялись суттєво від тих, що були виділені із нативної тканини [11, 12, 13, 14].

Для отримання життєздатних та функціонально активних ГСПК із зрілої плацентарної тканини в нашій роботі було проведено кріоконсервування фрагментів тканини із 0,7 М ДМСО та повільним ступінчастим охолодженням із автоматичним та контрольованим процесом ініціації кристалоутворення, як описано вище (див. підрозділ 2.7.). Нами розроблено спосіб виділення ГСПК із кріоконсервованої плацентарної тканини. За здійснення способу проводиться швидка ферментативна обробка тканини, що зменшує негативний вплив ферментів на клітини та не використовується бичача сироватка, яка може негативно впливати на клітини що надає можливість застосовувати клітини без можливих побічних ефектів від компонентів тваринного походження при лікуванні (див. підрозділ 2.10.).

На відміну від методу виділення ММСК із розмороженої тканини, для отримання ГСПК нами застосовано швидка ферментативна обробка протягом 10 – 15 хв лише колагеназою.

Було встановлено, що гемопоетичні прогенітори кріоконсервованої плаценти також містять популяції із різним рівнем експресії CD34 (рис. 3.15.).

Вміст ГСПК серед CD45⁺ клітин та серед фракції мононуклеарних клітин із кріоконсервованої зрілої плаценти становив 0,8 % (0,1 – 2,8 %, n = 3) та 0,4 % (0,3 – 0,6 %, n = 3) відповідно, що достовірно не відрізняється у порівнянні із ГСПК із нативної тканини. Вміст ГСПК серед популяції CD34⁺CD45^{low} клітин був 79,4 % (66,2 – 90,0 %, n=3), що практично не відрізняється від показників для нативної тканини. ГСПК із кріоконсервованої тканини, так само як і з нативної, містили субпопуляції CD34⁺CD45^{low}CD31^{hi} та CD34⁺CD45^{low}CD31^{low} клітин, а також експресували CD90.

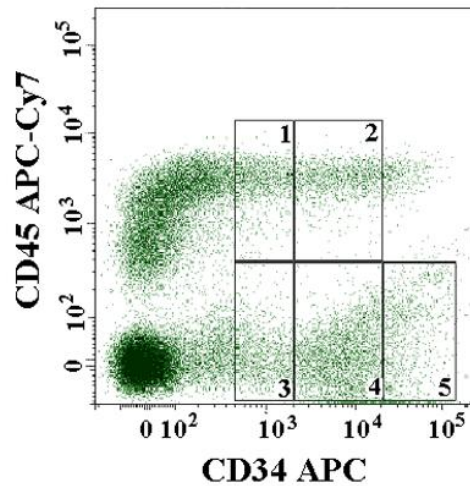


Рис. 3.15. Двовимірна гістограма, що показує наявність популяцій $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+/low}CD45^{+}$ та $CD34^{++}CD45^{+}$ клітин серед гемопоетичних прогеніторів, отриманих із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти

Вміст ГСПК серед $CD45^{+}$ клітин та серед фракції мононуклеарних клітин із кріоконсервованої зрілої плаценти становив 0,8 % (0,1 – 2,8 %, $n = 3$) та 0,4 % (0,3 – 0,6 %, $n = 3$) відповідно, що достовірно не відрізняється у порівнянні із ГСПК із нативної тканини. Вміст ГСПК серед популяції $CD34^{+}CD45^{low}$ клітин був 79,4 % (66,2 – 90,0 %, $n=3$), що практично не відрізняється від показників для нативної тканини. ГСПК із кріоконсервованої тканини, так само як і з нативної, містили субпопуляції $CD34^{+}CD45^{low}CD31^{hi}$ та $CD34^{+}CD45^{low}CD31^{low}$ клітин, а також експресували CD90.

Фракція клітин кріоконсервованої плаценти дає ріст різним типам колоній *in vitro*, що буде описано нижче (див. підрозділ 4.1.).

Таким чином, ГСПК із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти мають подібні властивості у порівнянні із ГСПК нативної тканини.

Відома робота, в якій автори описують метод кріоконсервування суцільної плаценти із застосуванням перфузії з кріопротекторами, такими як 15% пропіленгліколь, 14% ДМСО та 14% формахід [9].

Слід відзначити, що метод кріоконсервування, який нами застосовано у даній роботі, технічно простіший для виконання, дає можливість використовувати тканину

порційно, забезпечує краще проникнення кріопротектору, дозволяє використовувати лише один кріопротектор в невисокій концентрації.

Підсумовуючи вищенаведені експериментальні дані, можна зробити висновки, що гемопоетичні прогенітори як нативної, так і кріоконсервованої зрілої плаценти, характеризуються фенотиповою гетерогенністю. ГСПК плаценти, порівняно із пуповинною кров'ю, містять значну частку комітованих клітин на різних стадіях диференціювання що загалом свідчить про проходження активного гемопоезу в тканині зрілої плаценти, а застосований нами метод кріоконсервування із розробленим способом виділення клітин дає можливість отримати життєздатні та функціонально активні ГСПК.

Результати досліджень, поданих у розділі, опубліковано в працях:

1. Kuchma Maria D. Comparative analysis of the hematopoietic progenitor cells from placenta, cord blood and fetal liver, based on their immunophenotype // Maria D. Kuchma, Vitaliy M. Kyryk, Hanna M. Svitina, Yulia M. Shablii, Lubov L. Lukash, Galina S. Lobyntseva, Volodymyr A. Shablii // BioMed Research International. – vol. 2015, Article ID 418752, 16 pages, 2015. doi:10.1155/2015/418752.
2. Kuchma M. Phenotypic heterogeneity of hematopoietic progenitor cells from placental tissue: comparative analysis with umbilical cord blood and fetal liver / Kuchma M, Shablii V, Kyryk V, Onishchenko A, Shablii Yu, Lukash L, Lobintseva G. // Cell and organ transplantology. – 2013. – Vol. 1. – № 1. – P. 66–69.
3. Kuchma M. Comparative phenotypic analysis of populations of hematopoietic progenitor cells with different expression level of CD34 derived from placental tissue and umbilical cord blood / Kuchma M, Shablii V, Kyryk V, Onishchenko A, Lukash L, Lobintseva G. // Bulletin of Kyiv National University of Taras Shevchenko. – 2013. – Vol. 2. – № 64. – P. 18–22.
4. Кучма М.Д. Гемопоетичні прогеніторні клітини плаценти та пуповинної крові: імунофенотиповий аналіз та потенціал до диференціації *in vitro* / М.Д. Кучма, В.А. Шаблій, В.М. Кирик, А.Н. Світїна Г.М., Ю.М. Шаблій, Прокопець Ю.К., Індиченко Т.М., Л.Л. Лукаш, Г.С. Лобинцева // Biotechnologia Acta. – 2014. – Т. 7 - №. 4 – С. 61–70.
5. Кучма М.Д. Схожість та відмінність популяції гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин із різних тканин людини / М.Д. Кучма, В.М. Кирик, А.Н. Г.М. Світїна, Ю.М. Шаблій, Л.Л. Лукаш, Г.С. Лобинцева, В.А. Шаблій // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т.17. – С. 200–204.
6. Шаблій В.А. Криоконсервирование ткани плаценты человека как источника гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / В.А. Шаблій, М.Д. Кучма, В.М. Кирик, А.Н. Онищенко, Л.Л. Лукаш, Г.С. Лобинцева // Клеточная трансплантология и тканевая

инженерия. – 2012. – Т. 7. - № 1. – С. 54 – 62.

7. Пат. UA 103053. Спосіб виділення гемопоетичних прогеніторних/стовбурових клітин / Винахідники Кучма М., Шаблій В., Лобинцева Г., Кирик В., Лукаш Л.; Власник – Товариство із обмеженою відповідальністю Інститут клітинної терапії. - № u 201507346; заявл. 21.07.2015; опубл. 25.11.2015; Бюл. № 22.

РОЗДІЛ 4

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ГСПК ЗРІЛОЇ ПЛАЦЕНТИ *IN VITRO* У ПОРІВНЯННІ З ПУПОВИННОЮ КРОВ'Ю

Нами встановлено, що ГСПК плаценти містять значну частку комітованих клітин на різних стадіях диференціювання. Як відомо, плацентарні гемопоетичні прогенітори мають потенціал до мультипотентного диференціювання *in vitro*. Однак кількісне співвідношення різних типів колоній, які утворюються в культурі, залишається не з'ясованим. Крім того, проведення їх порівняльного аналізу із мультипотентністю ГСПК пуповинної крові дозволить оцінити функціональну активність ГСПК зрілої плаценти, що є важливим для оцінки можливості їх клінічного застосування. Крім того, при культивуванні можуть утворюватись колонії, опис яких не представлено у літературі, тому ці дослідження необхідні для проведення коректного підрахунку різних типів колоній.

4.1. Мультипотентний потенціал *in vitro* фетальних ГСПК зрілої плаценти у порівнянні із пуповинною кров'ю

При культивуванні *in vitro* моноклеарної фракції клітин із зрілої плаценти на 14 добу утворювались колонії всіх типів: CFU-B, CFU-E, CFU-M, CFU-GM, CFU-GMEM (рис.4.1, *а, в, д, є, ж*). Основним методом ідентифікування колоній в нашій роботі був метод, що заснований на визначенні морфології колоній за допомогою світлової мікроскопії на «живих» препаратах. Також нами проведено фарбування колоній гемопоетичних клітин азур-еозином (рис.4.1, *б, з, е*). Так, при фарбуванні колоній еритроцитів на фоні блакитного виявляли оранжевий колір, частина гранулоцитів давала фіолетове забарвлення (рис.4.1, *з, нижня стрілка*), а моноцити фарбувались у блакитний колір (рис.4.1, *з, верхня стрілка*). Виявлена нами клональна активність свідчить про наявність в тканині плаценти попередників гранулоцитів, моноцитів та еритроцитів.

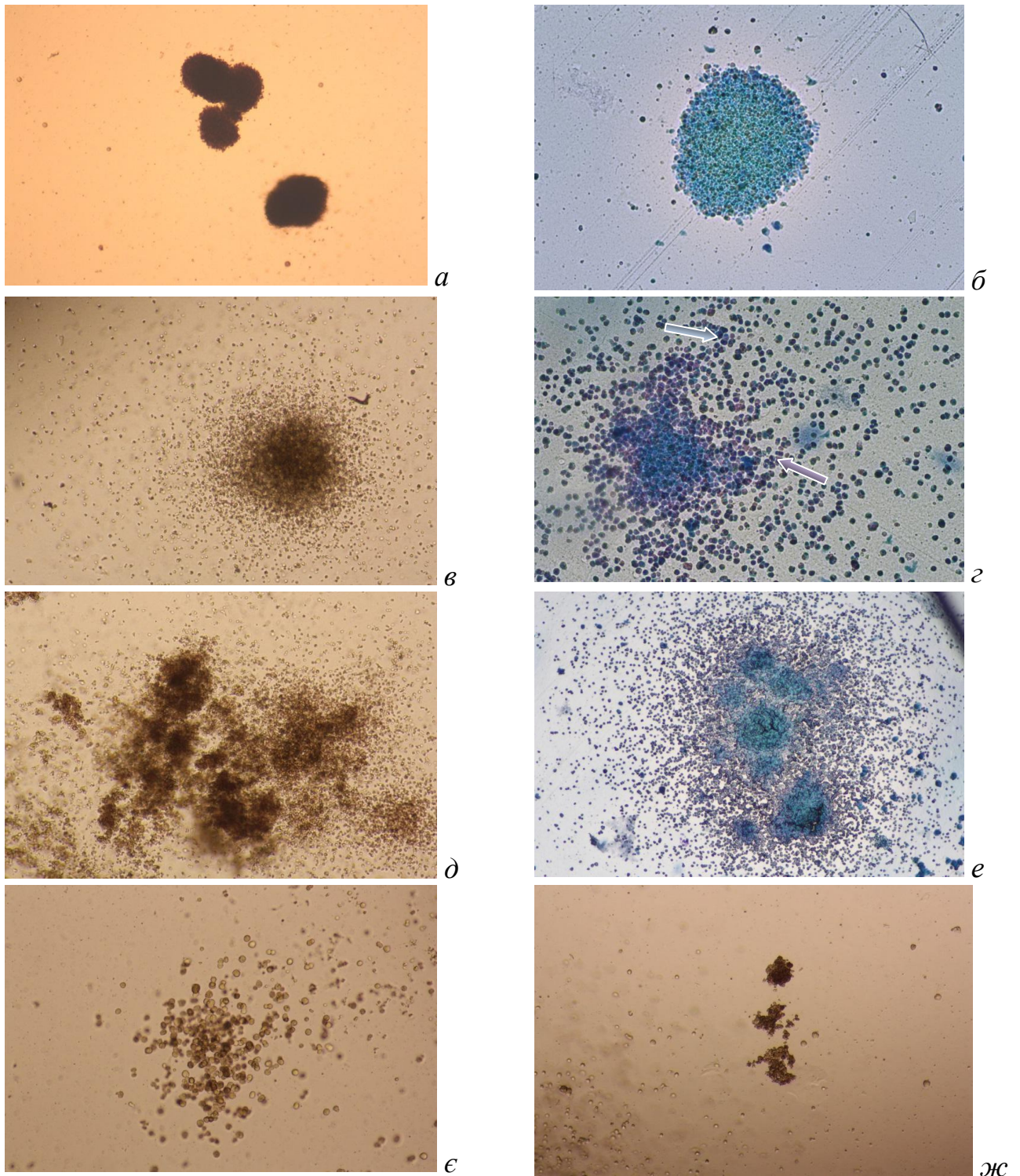


Рис. 4.1. Колонії клітин плацентарної тканини, утворені *in vitro*: а, б – BFU-E; в, г – CFU-GM; д, е – CFU-GEMM; є – CFU-M; ж – CFU-E; а, в, д, є - світлова мікроскопія; б, г, е - фарбування азур-еозином за Романовським; ок. $\times 10$, об. $\times 5$, та ок. $\times 10$, об. $\times 10$ для б та г

При культивуванні моноклеарної фракції плаценти та ядровмісних клітин

пуповинної крові утворюються подібні типи колоній, що свідчить про схожі мультипотентні властивості (рис. 4.2.).

В літературі вже є свідчення стосовно здатності плацентарних ГСПК утворювати всі типи кровотворних колоній [16, 17].

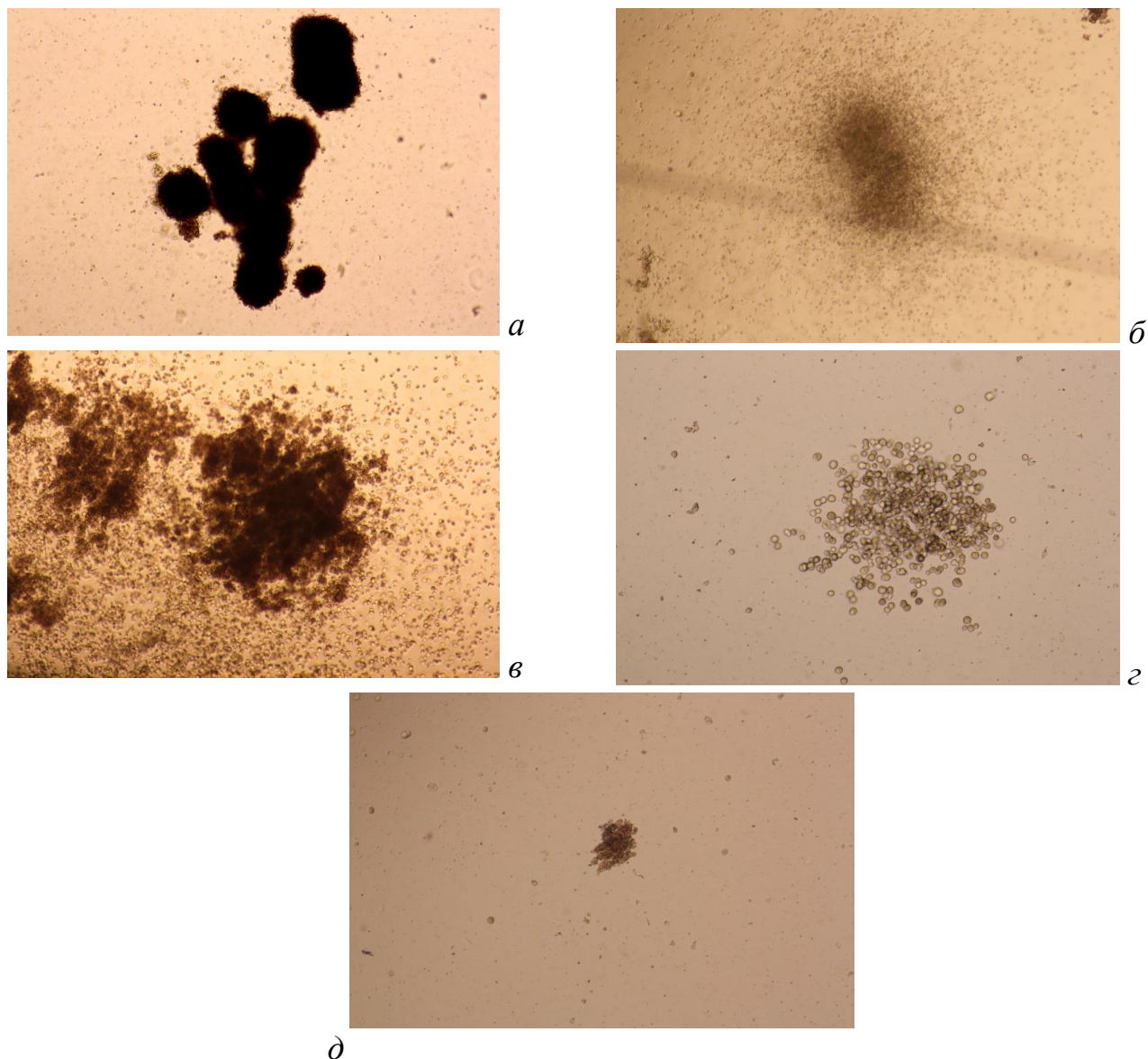


Рис. 4.2. Колонії клітин пуповинної крові, утворені *in vitro*: а – CFU-B; б – CFU-GM; в – CFU- GEMM; з – CFU-M; д – CFU-E, світлова мікроскопія, ок. 10×, об. 5×

Порівняння відносного 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 (рис. 4.3.). Однак відносний вміст мієлоїдно- та еритроїдно-комітованих ГСПК серед усіх комітованих гемопоетичних прогеніторів, як ми показали за допомогою FACS аналізу, не відрізняється.

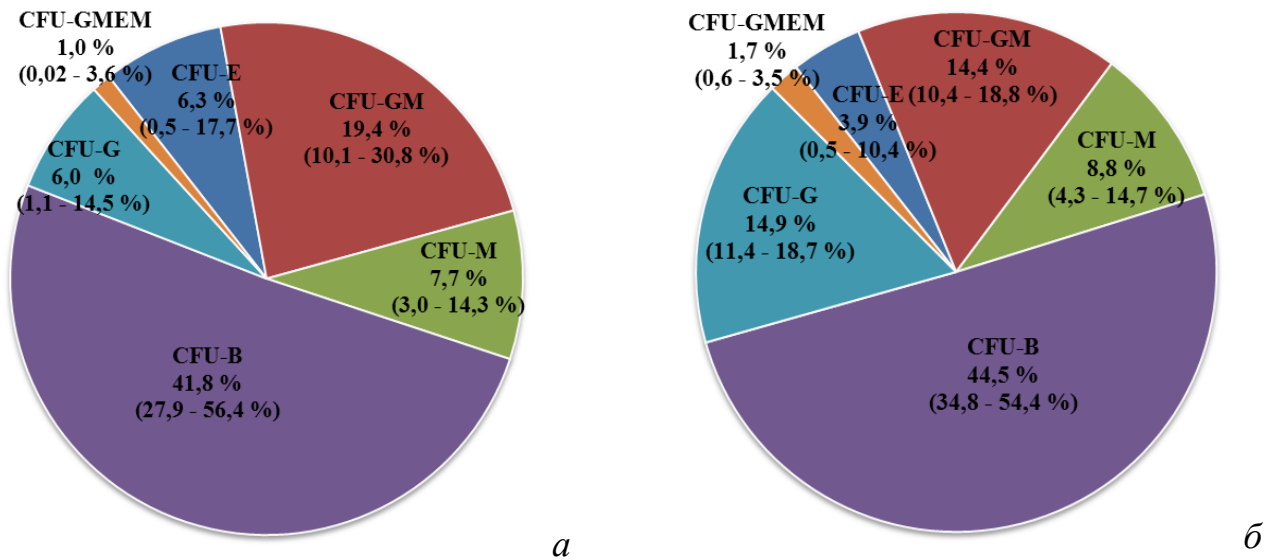


Рис. 4.3. Колоніє-утворювальний потенціал клітин плацентарної тканини (а) та пуповинної крові (б) *in vitro*, n(плацента)=6, n(пуповинна кров)=10, $p \leq 0,05$

За даними Varsena та співавторів, $CD34^+CD45^{low}$ клітини із зрілої плаценти продукують незначну кількість еритроїдних колоній в той час, коли гемопоетичні клітини плаценти першого та другого триместру не генерують BFU-E, що вказує на відмінності властивостей плацентарних ГСПК в залежності від стадії розвитку плоду [8]. Інші автори відмічають, що відносний вміст BFU-E однаковий в тканині плаценти людини на 6, 9, 15 тижнях гестації, однак, починаючи із 9 тижня гестації, спостерігається значне зростання вмісту CFU-GM, CFU-Mix [9].

Нами проведено аналіз різних типів колоній, що утворювались при культивуванні клітин мононуклеарної фракції із плацент новонароджених чоловічої статі методом FISH із використанням X (червоний) та Y (зелений) хромосом-специфічних проб. Встановлено, що гемопоетичні клітини мали X та Y хромосоми (рис. 4.4.). Такі результати свідчать про належність плоду прогеніторних клітин із мультилінійним потенціалом, що виділені із тканини зрілої плаценти.

Раніше повідомлялось, що при культивуванні $CD34^+$ та $CD34^-$ клітин плаценти 9 тижня гестації утворюються CFU-Mix, які складаються із клітин плоду [17], крім того, показано фетальне походження колоніє-утворювальних клітин зрілої плаценти [8].

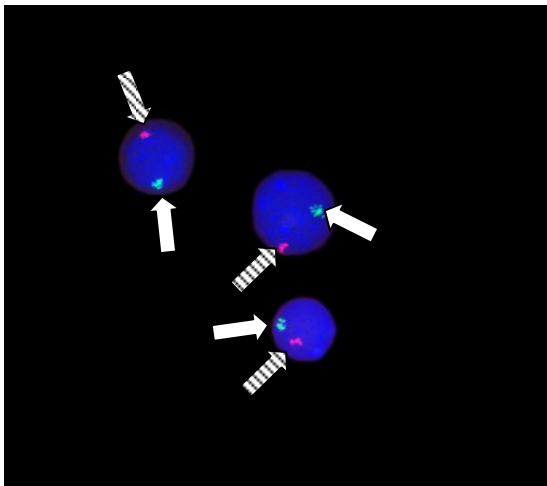


Рис. 4.4. FISH аналіз клітин колоній, що уворювались після 14 діб культивування у метилцелюлозо-вмісному середовищі фракції мононуклеарних клітин зрілої плаценти: X хромосома – зелений сигнал (вказано білою стрілкою), Y хромосома – червоний сигнал (вказано заштрихованою стрілкою), ок. 10×, об. 100×

Метод кріоконсервування фрагментів тканини зрілої плаценти дозволяє зберігати функціонально активні ГСПК, про що свідчить утворення колоній різних типів при культивуванні клітин, виділених із розмороженої тканини (рис. 4.5.).

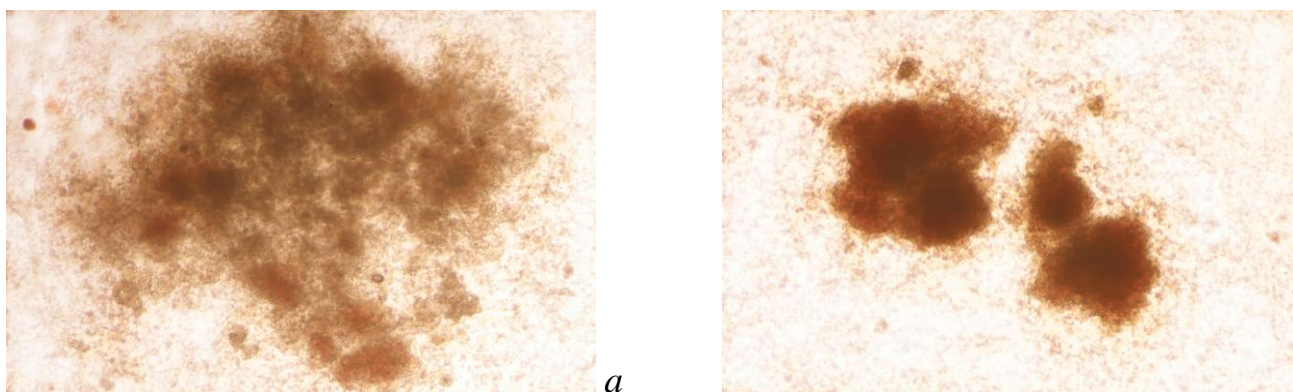


Рис. 4.5. Колонії клітин, отриманих ферментативним методом із кріоконсервованої зрілої плацентарної тканини: *а* – CFU-GEMM; *б* –BFU-E ; ок. ×10, об. ×5

4.2. Виявлення та характеристика плоских еритроїдних колоній у напівтвердих культуральних середовищах

При визначенні колоніє-утворювальної активності ГСПК оцінюється кількість різних типів колоній в напівтвердому культуральному середовищі при посіві певної кількості клітин. При довготривалому культивуванні нами було виявлено колонії, які важко класифікувати без використання додаткових методів дослідження. Так, ми спостерігали наявність плоских еритроїдних колоній (ПЕК) (рис 4.6.), що не описані в літературі [135]. ПЕК, як було нами показано, зустрічались при культивуванні моноклеарної фракції плацентарних клітин. Для того, щоб з'ясувати чи є утворення ПЕК особливістю саме плацентарних клітин, нами було досліджено можливість їхньої появи у напівтвердих середовищах при культивуванні клітин пуповинної крові, а також «мобілізованої» периферичної крові. Необхідним було охарактеризувати отримані ПЕК та встановити фенотип клітин, які в них містяться.

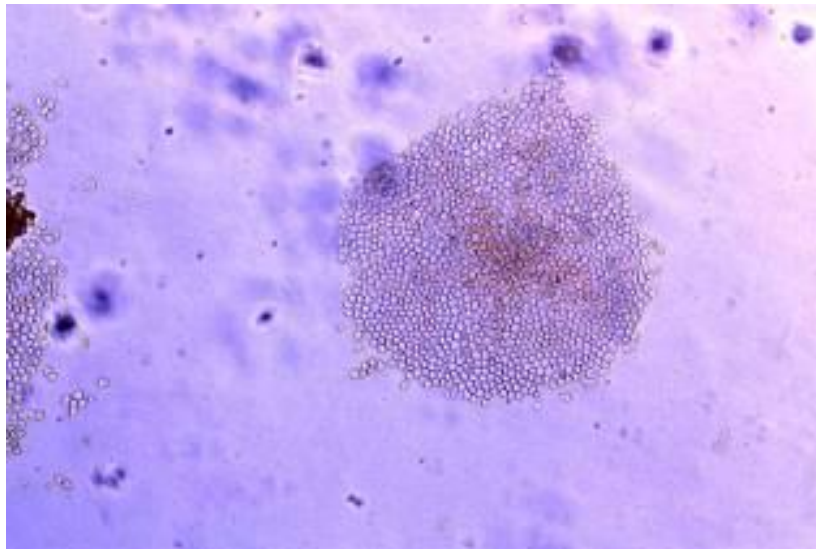


Рис. 4.6. ПЕК нативної пуповинної крові в агаровмісному напівтвердому середовищі, 14 доба культивування, світлова мікроскопія, ок. 10×, об. 10×

Ми виявляли ПЕК в $58 \% \pm 4,8 \%$ ($n=108$) випадків при культивуванні ядровмісних клітин (ЯК) як нативної, так і кріоконсервованої пуповинної крові в агаровмісному середовищі. Однак при культивуванні нативної або

кріоконсервованої пуповинної крові в метилцелюлозо-вмісному середовищі (n=238) вірогідність появи ПЕК, на відміну від агаровмісного середовища, була достовірно нижчою (p=0,0006) і становила $2,5 \% \pm 1\%$. Розрахунок вірогідності появи таких колоній проводили загалом для ЯК нативної та кріоконсервованої пуповинної крові, оскільки кріоконсервування пуповинної крові не впливало на вірогідність появи ПЕК. Про це свідчила відсутність достовірної різниці в частотах появи таких колоній в культурі нативної (n=138) та кріоконсервованої (n=108) пуповинної крові в метилцелюлозо-вмісному середовищі (p=0,0006) та нативної (n=54) і кріоконсервованої (n=44) пуповинної крові в агаровмісному середовищі (p=0,0006). Відносна кількість ПЕК для ЯК пуповинної крові не залежала від складу середовища і становила 4,4 % (0,9 – 10,6 %) (n=6) в метилцелюлозо-вмісному середовищі та 3,6 % (2,1 – 5,6 %) (n=58) в агаровмісному середовищі, однак в окремих випадках їхня кількість досягала майже 50 %. При цьому відносна кількість ПЕК пуповинної крові була достовірно вищою (p<0,01), ніж кількість CFU-GEMM, відсоток яких складав 1,7 (0,6 – 3,5 % при n=20). Відносна кількість ПЕК плацентарної тканини в агаровмісному середовищі становила 16,2 % (7,3 – 27,7 % при n=4).

При культивуванні ПЕК пуповинної крові, плаценти або мобілізованої периферичної крові в напівтвердому середовищі в культуральних чашках утворювались кластери, що складались з 3-12 клітин, які розміщувались поодинокі на невеликій відстані або утворювали моношари вже на 7 добу (рис. 4.7, а), які могли досягати великих розмірів у порівнянні з колоніями інших типів. Вже на початку культивування такі кластери добре помітні та відрізняються від усіх інших клонів (рис. 4.7, б). На 14 добу культивування вони, як правило, правильною округлою форми та мають чітко окреслені краї (рис. 4.7, а). Клітини в колонії щільно прилягають одна до одної. На 14 добу в структурі колонії можуть утворюватись один (рис. 4.7, в) або декілька агрегатів (рис. 4.7, г), які мають червоне забарвлення. В деяких випадках такі колонії перетворювались в величезні поля клітин (рис. 2д). Тільки на 17 добу культивування клітини починали руйнуватися (рис. 4.7, е).

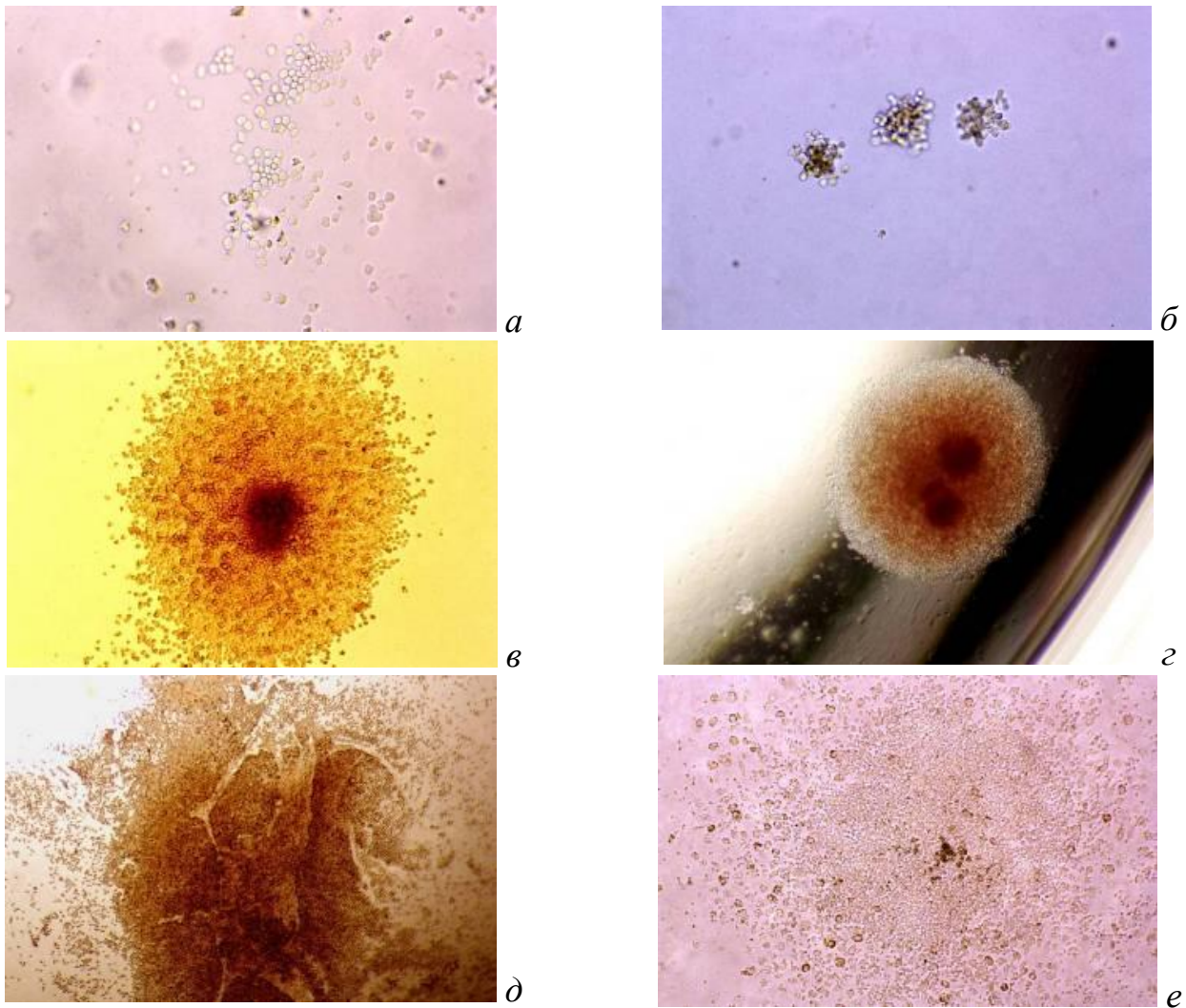


Рис. 4.7. Колонії клітин нативної пуповинної крові в агаровмісному напівтвердому середовищі: а – ПЕК та б – еритроїдна або мієлоїдна колонія, 7 доба культивування, світлова мікроскопія, ок. 10×, об. 10×; в – ПЕК з одним агрегатом, 14 доба культивування, світлова мікроскопія, ок. 10×, об. 10×; г – ПЕК з двома агрегатами та д – велика колонія у вигляді поля, 14 доба культивування, світлова мікроскопія, ок. 10×, об. 5×; е - зруйновані клітини ПЕК, 17 доба культивування, світлова мікроскопія, ок. 10×, об. 10×

При культивуванні ЯК пуповинної крові в метилцелюлозо-вмісному середовищі, а також ЯК кріоконсервованої пуповинної крові, плаценти та мобілізованої периферичної крові в агаровмісному середовищі ПЕК утворюються таким самим чином, як описано вище, і вони мають такий самий вигляд, як ПЕК нативної пуповинної крові в агаровмісному середовищі (рис. 4.8.).

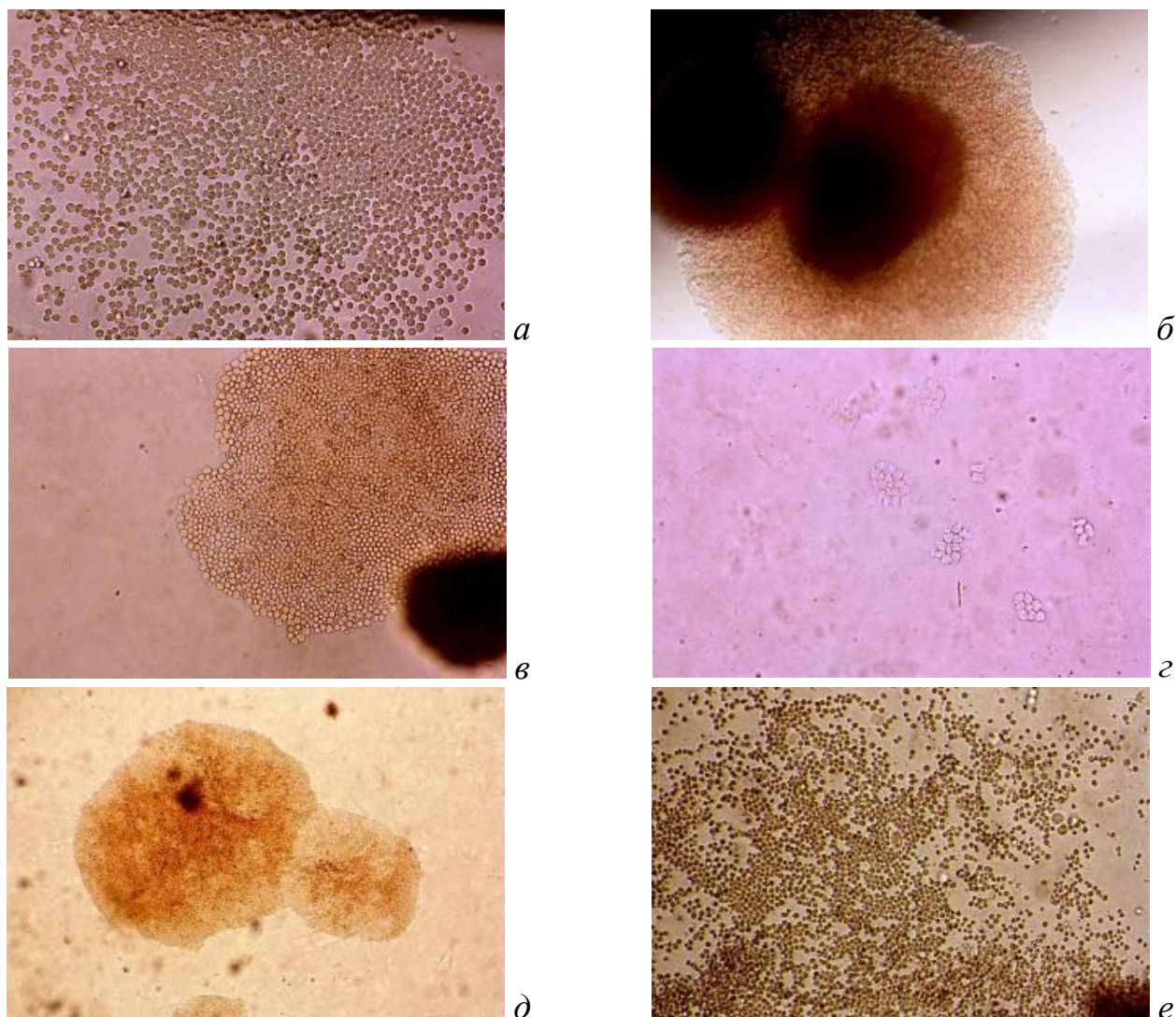


Рис. 4.8. *a* – ПЕК, ок. 10×, об. 10× та *б* – ПЕК з одним агрегатом, ок. 10×, об. 5× нативної пуповинної крові в метилцелюлозо-вмісному середовищі, 14 доба культивування; *в* – ПЕК клітин кріоконсервованої пуповинної крові, 14 доба культивування, світлова мікроскопія, ок. 10×, об. 10×; *г* – початок утворення ПЕК, 5 доба культивування, ок. 10×, об. 10× та *д* – колонія з агрегатом клітин плацентарної тканини, 14 доба культивування, ок. 10×, об. 5×, світлова мікроскопія; *е* – ПЕК клітин «мобілізованої» периферичної крові, 14 доба культивування, ок. 10×, об. 5×; світлова мікроскопія

Таким чином, при ідентифікації колоній з використанням світлового мікроскопу ПЕК схожі на CFU-GEMM, оскільки вони мають великі розміри та можуть містити агрегат еритроїдних клітин. CFU-GEMM – колонії, які частіше

містять в центрі еритроїдні клітини, а також гранулоцити, макрофаги, мегакаріоцити, які розміщуються на периферії. Значно рідше останні концентруються з іншого боку від еритроїдних клітин, при цьому такі колонії більші за розмірами, ніж BFU-E та CFU-GM, зустрічаються відносно рідко та в більшості зразків присутні в кількості менше 10 % [155]. Однак, як показали проведені нами дослідження, ПЕК не відносяться до CFU-GEMM.

Природу ПЕК було встановлено за допомогою проточної цитометрії та імуноцитохімічного аналізу. Оскільки вірогідність виявлення ПЕК була більшою в агаровмісному середовищі, дослідження імунофенотипу таких колоній ми проводили в культурі ЯК нативної пуповинної крові з використанням середовища, до складу якого входив агар.

Клітини, які нами проаналізовано, були переважно ізольовані з колоній, які не містили яскраво вираженого еритроїдного агрегату. Результати проточної цитометрії клітин, ізольованих з ПЕК показали, що 92 % клітин експресують CD235 (рис. 4.9, а). При цьому 80,8 % клітин мали фенотип $CD235^+CD33^-CD14^-$. Також були присутні клітини, що мали фенотип $CD235^+CD33^+CD14^+$ у кількості 5,2 %, а також клітини з фенотипом $CD235^+CD33^-CD14^+$ у кількості 4,9 % та 1 % $CD235^+CD33^+CD14^-$ клітин. Клітини з таким фенотипом зустрічаються також в популяціях нативної пуповинної крові (рис. 4.9, в) та плацентарної тканини (рис. 4.9, г). Серед проаналізованих клітин ми виявили 13 % клітин, що експресували CD33 та 16,9 % клітин з експресією CD14, при цьому 11,6 % клітин мали фенотип $CD33^+CD14^+$, 5,4 % – з фенотипом $CD33^-CD14^+$ та 1,8 % – з фенотипом $CD33^+CD14^-$ (рис. 4.9, б).

Таким чином, більшість проаналізованих клітин ПЕК була еритроїдними, а та частина мієлоїдних клітин, яку ми виявили при аналізі ПЕК, може відноситись до макрофагів та їхніх попередників, які, як відомо, підтримують еритропоез в гемопоетичних тканинах [4, 60, 156]. Не виключено, що ці клітини могли потрапити із сусідніх колоній при виділенні ПЕК. Цікаво, що досліджувані клітини містили невелику кількість клітин з фенотипами $CD235^+CD33^+CD14^+$, $CD235^+CD33^-CD14^+$ та $CD235^+CD33^+CD14^-$. Нами також показано, що наявність клітин з таким

фенотипом характерна для нативної пуповинної крові та тканини плаценти. Відомо, що еритроїдна та мієлоїдна лінія диференціювання мають спільні клітини-попередники. Тож, можливо, що ПЕК або містять такі мієлоеритроїдні прогенітори, або вони також потрапили до аналізованих клітин із сусідніх колоній.

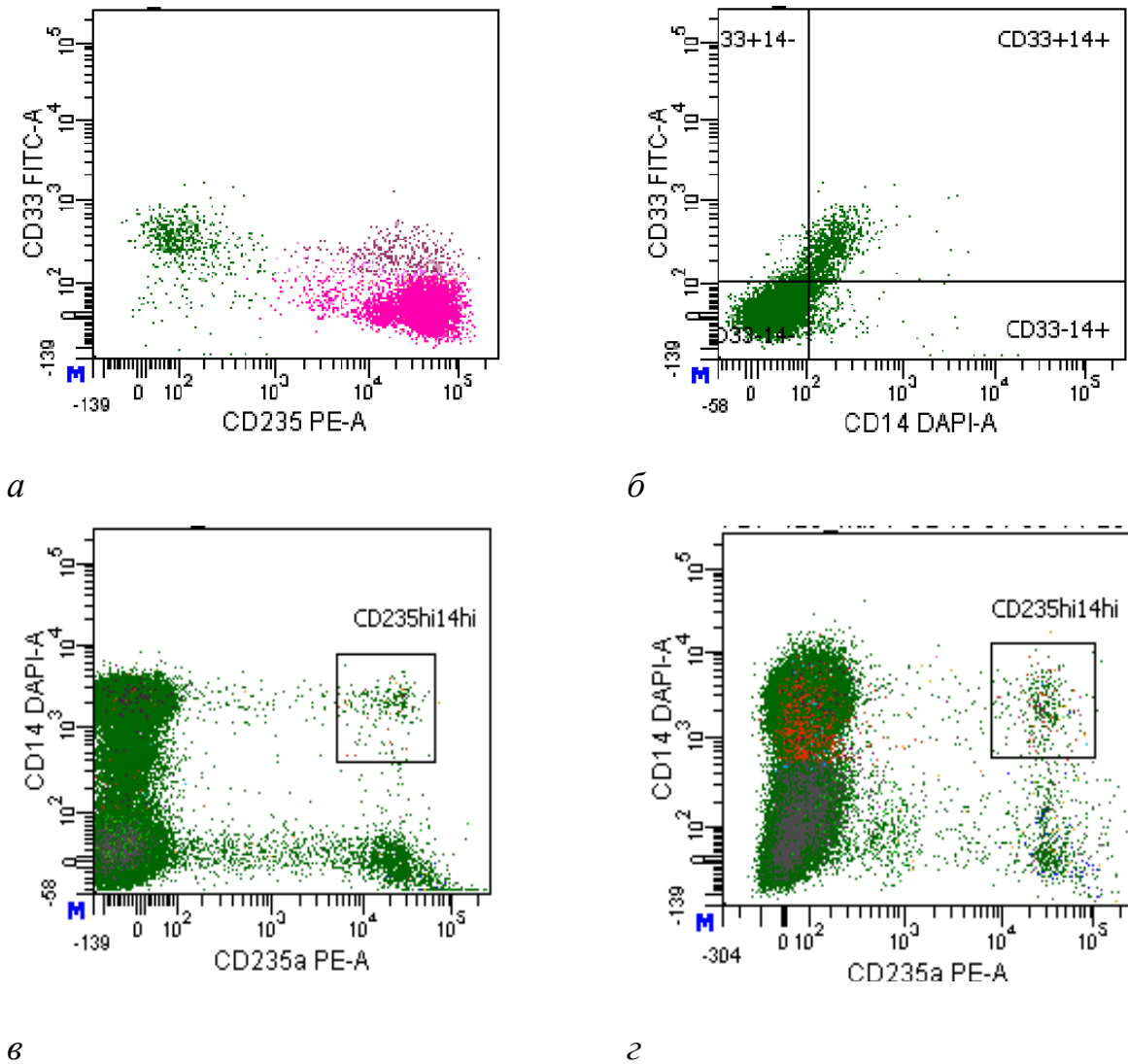


Рис. 4.9. Двовимірні гістограми експресії поверхневих маркерів CD235 та CD33 (*a*), CD14 та CD33 (*б*) на клітинах ПЕК нативної пуповинної крові на 15 добу культивування в агаровмісному середовищі; двовимірні гістограми експресії поверхневих маркерів CD235 та CD14 на нативних клітинах пуповинної крові (*в*) та плаценти (*г*); по осях відкладена інтенсивність флюоресценції на відповідних каналах (програма BD FACSDiva 6.1.2)

Тому, для підтвердження еритроїдної природи таких колоній нами було проаналізовано імуноцитохімічним аналізом клітини ПЕК, які не містили еритроїдного агрегату, і виявлено експресію CD235 (рис. 4.10.).

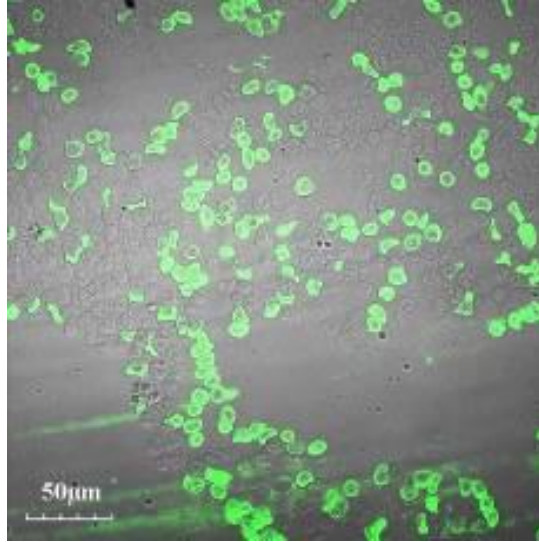


Рис. 4.10. Виявлення експресії CD235 на поверхневій мембрані клітин ПЕК без агрегатів в культурі ЯК пуповинної крові в агаровмісному середовищі, комбінація флюоресцентної мікроскопії та фазового контрасту

Отримані дані дають підстави стверджувати, що ПЕК, які зустрічаються при культивуванні ЯК пуповинної крові, плаценти та мобілізованої периферичної крові в напівтвердому середовищі, є еритроїдними. Однак морфологія ПЕК суттєво відрізняється від морфології BFU-E та CFU-E.

За визначенням, CFU-E – невеликі колонії у вигляді одного або двох кластерів червоного або коричневого кольору, що містять 8–200 еритробластів. BFU-E – колонії у вигляді одного або декількох кластерів червоного або коричневого кольору, що містять більше 200 клітин, які є менш диференційованими еритроїдними прогеніторами, ніж клітини колоній CFU-E [157, 155].

Нами було показано, що ПЕК здатні перетворюватися в величезні поля клітин, а це свідчить про високу проліферативну активність клітин-попередників, які утворюють такі колонії, і про те, що вони можуть бути дуже ранніми прогеніторами. Тому слід вважати, що при визначенні морфології колоній після

культивування в напівтвердому середовищі, ПЕК варто виділяти в окрему групу колоній, або відносити до BFU-E, оскільки вони утворені з ранніх еритроїдних прогеніторів.

Тож нами вперше встановлено, що плацентарна тканина, як і пуповинна кров та мобілізована периферична кров, містить прогенітори, які дають ріст ПЕК. Наше спостереження щодо подібності росту еритроїдних ПЕК, утворених клітинами плаценти, пуповинної крові та «мобілізованої» периферичної крові, є важливим, оскільки показує схожість гемопоетичних прогеніторних клітин різних джерел, досліджених в даній роботі. Аналогічних даних не описано в доступній літературі.

Таким чином, на основі вищеописаних у розділі експериментальних даних, можна зробити висновок, що ГСПК зрілої плаценти у порівнянні із пуповинною кров'ю мають подібний мультипотентний потенціал *in vitro*.

Результати досліджень, поданих у розділі, опубліковано в працях:

1. Kuchma Maria D. Comparative analysis of the hematopoietic progenitor cells from placenta, cord blood and fetal liver, based on their immunophenotype // Maria D. Kuchma, Vitaliy M. Kyryk, Hanna M. Svitina, Yulia M. Shablii, Lubov L. Lukash, Galina S. Lobytseva, Volodymyr A. Shablii // BioMed Research International. – vol. 2015, Article ID 418752, 16 pages, 2015. doi:10.1155/2015/418752.
2. Кучма М.Д. Гемопоетичні прогеніторні клітини плаценти та пуповинної крові: імунофенотиповий аналіз та потенціал до диференціації *in vitro* / М.Д. Кучма, В.А. Шаблій, В.М. Кирик, А.Н. Світін Г.М., Ю.М. Шаблій, Прокопець Ю.К., Індиченко Т.М., Л.Л. Лукаш, Г.С. Лобинцева // Biotechnologia Acta. – 2014. – Т. 7 - №. 4 – С. 61–70.
3. Кучма М.Д. Характеристика плоских колоній, утворених еритроїдними прогеніторами пуповинної крові, плаценти та «мобілізованої» периферичної крові в напівтвердих культуральних середовищах / М.Д. Кучма , В.А. Шаблій , В.М. Кирик , А.Н. Світін Г.М. Прокопець Ю.К., Індиченко Т.М. , Цупіков О.М. , Л.Л. Лукаш , Г.С. Лобинцева // Biotechnologia Acta. – 2014. – Т. 7 - №3. – С. 60–68.
4. Шаблій В.А. Криоконсервирование ткани плаценты человека как источника гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / В.А. Шаблій, М.Д. Кучма, В.М. Кирик, А.Н. Онищенко, Л.Л. Лукаш, Г.С. Лобинцева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. - № 1. – С. 54 – 62.

РОЗДІЛ 5

УЗАГАЛЬНЕННЯ І АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

В даній роботі нами охарактеризовано імунофенотип ГСПК плацентарної тканини у порівнянні із відповідними клітинами пуповинної крові та фетальної печінки, і при цьому вперше виявлено певні подібності та відмінності. Крім того, показано схожість потенціалу до диференціювання *in vitro* ГСПК плацентарної тканини та пуповинної крові.

Нами показано, що суміш ферментів для отримання суспензії плацентарних клітин має неоднозначний вплив на результати проточної цитофлюорометрії. Незважаючи на те, що експресія CD7, CD33, CD14, CD19, CD34, CD45, CD235, CD45RA маркерів не змінювалась, однак у зразках пуповинної крові після ферментативної обробки спостерігалось зростання вмісту клітин з фенотипами CD7⁺CD45RA⁺ та CD45⁺CD45RA⁺. Іншими авторами також було відмічено зміну результатів FACS аналізу після ферментативної обробки клітин в роботі [136], яка демонструє зниження інтенсивності експресії деяких маркерів, тоді як нами встановлено збільшення кількості клітин у досліджуваних субпопуляціях після ферментативної обробки. Тому, при проведенні порівняльного дослідження клітин, виділених за допомогою суміші ферментів із різних тканин, необхідно уніфікувати протокол їх отримання та підготовки для аналізу. Виходячи з цього, при проведенні порівняльного дослідження імунофенотипу ГСПК плаценти та пуповинної крові, була проведена однакова пробопідготовка експериментальних зразків тканин.

В нашій роботі було модифіковано метод виділення ГСПК тканини плаценти шляхом зменшення кількості ферменту гіалуронідази у суміші ферментів коллагенази, ДНКаз та гіалуронідази [8]. Такий метод, на нашу думку, варто застосовувати для аналізу тканини, оскільки він дозволяє повністю її руйнувати. Однак, коллагеназа негативно впливає на клітини, і вплив залежить від концентрації та часу дії ферменту [158]. Тому в нашій роботі запропоновано метод виділення

ГСПК із зрілої тканини плаценти із частковою заміною колагенази на диспазу. Обидва методи, що застосовано в нашій роботі дозволяли отримувати ГСПК, вміст яких серед CD45⁺ клітин достовірно не відрізнявся.

Було підібрано протокол імунофенотипування фракції плацентарних моноклеарних клітин, а саме, обрано одноплатформений протокол ISHAGE. Раніше такий протокол було прийнято використовувати для аналізу ГСПК кісткового мозку та пуповинної крові. Нами показано, що стратегія гейтування ISHAGE може бути прийнятною для аналізу ГСПК плацентарної тканини. За нашими даними міст ГСПК серед CD34⁺CD45^{low} клітин в плацентарній тканині та фетальній печінці не відрізнявся, але був достовірно нижчим у порівнянні з пуповинною кров'ю. Оскільки вважається, що лімфоцитоподібні CD34⁺CD45^{low} клітини є «справжніми» ГСПК, для кількісного аналізу останніх в таких гемопоетичних тканинах, як плацентарна та фетальна печінка, важливим є етап гейтування за морфологією. Дані щодо такого гейтування при аналізі ГСПК плацентарної тканини у відомій літературі відсутні.

Вперше показано, що для ГСПК плацентарної тканини, на відміну від пуповинної крові, характерна імунофенотипова гетерогенність. Раніше, в плацентарній тканині виділяли лише дві популяції за інтенсивністю експресії CD34, а саме CD34^{low}CD45^{low} та CD34^{hi}CD45^{low} [16]. Однак, порівняльний аналіз показав, що більш коректним є виділення трьох популяцій за інтенсивністю експресії CD34. У фетальній печінці, ймовірно, також можна виділяти три популяції, хоча інтенсивність експресії CD34 є нижчою у порівнянні із такими популяціями плацентарної тканини.

Інші автори у фетальній печінці також виділяють три популяції за експресією CD34 [114]. Особливістю плацентарної тканини є те, що на відміну від пуповинної крові та фетальної печінки, в ній присутні дві популяції CD34^{+/low}CD45^{hi} та CD34⁺⁺CD45^{hi}. Такі клітини є пізніми гемопоетичними прогеніторами, що переважно комітовані, оскільки експресують лінійні гемопоетичні маркери. Таким чином, плацентарна тканина містить усі популяції ГСПК, що спостерігаються у

пуповинній крові та фетальній печінці, однак відрізняється від останніх тим, що в ній присутні гемопоетичні прогенітори більш пізніх етапів диференціювання.

Вперше з'ясовано, що у порівнянні з ГСПК пуповинної крові, ГСПК плацентарної тканини мають достовірно вищий рівень експресії CD90, що може свідчити про більш високий вміст ранне-комітованих ГСПК в плацентарній тканині у порівнянні з пуповинною кров'ю.

Нами показано, що популяції CD34⁺⁺CD45^{low/-} плацентарної тканини та пуповинної крові є найбільш ранніми клітинами, про що свідчить експресія CD133. При цьому, рівень експресії такого маркера достовірно не відрізняється для ГСПК обох джерел.

Вперше встановлено, що плацентарні ГСПК містять дві популяції з різною інтенсивністю експресії CD31, а саме: CD34⁺CD45^{low}CD31^{hi} та CD34⁺CD45^{low}CD31^{low}. При цьому в пуповинній крові спостерігаються лише CD34⁺CD45^{low}CD31^{low} клітини. Такі дані можуть свідчити про різницю у фенотиповому профілі циркулюючих клітин пуповинної крові та клітин, що розміщені в екстравакулярних компертменах, оскільки білок CD31 забезпечує взаємодію із стромальними клітинами ніші.

Показано, що пуповинна кров, плацентарна тканина та фетальна печінка містять значну кількість ГСПК, що не експресують жодних з аналізованих лінійних маркерів, тобто незрілих елементів крові.

Вперше встановлено, що вміст лінійно-комітованих прогеніторів серед ГСПК в плацентарній тканині достовірно вищий, ніж, у пуповинній крові та нижчий по відношенню до фетальної печінки. При цьому сумарний вміст лімфоїдних прогеніторів серед ГСПК достовірно більший в фетальній печінці, ніж в пуповинній крові та плацентарній тканині. Загальний вміст проаналізованих мієлоїдних та еритроїдних прогеніторів серед ГСПК вищий в плацентарній тканині порівняно з пуповинною кров'ю, однак нижчий, ніж в фетальній печінці.

Особливістю плацентарної тканини, на відміну від пуповинної крові, є наявність субпопуляції ГСПК, що експресує CD14. Серед такої субпопуляції також є клітини, які ко-експресують CD33. Слід зазначити, що деякі зразки плаценти, на

відміну від пуповинної крові мали у 10 разів більше лімфоїдних CD7⁺ прогеніторів у складі ГСПК, хоча загалом достовірної різниці не спостерігалось, що може бути пов'язано із відносно невеликою вибіркою або із наявністю в таких зразках інфекційних агентів, які не увійшли у перелік протестованих, або резус-конфлікту між плодом та материнським організмом.

Наші дані свідчать про проходження мієлопоезу, еритропоезу, та, можливо, лімфопоезу у зрілій плацентарній тканині. В відомих роботах, присвячених гемопоезу плаценти [8, 10, 17] зазначається, що у плаценті проходить мієлопоез та еритропоез, однак на другому тиместрі вагітності, або зовсім не уточнюється термін. У роботі [9], що присвячена дослідженню тканини зрілої плаценти не наведено даних щодо наявності різних комітованих гемопоетичних попередників у тканині.

Нами показано, що моноклеарна фракція клітин із зрілої плаценти при культивуванні *in vitro* на 14 добу утворює колонії всіх типів: CFU-B, CFU-E, CFU-M, CFU-GM, CFU-GMEM у рівних співвідношеннях, як і при культивуванні ядровмісної фракції клітин пуповинної крові, що свідчить про подібний диференціувальний потенціал. В роботі підтверджено, що мультилінійні ГСПК плаценти мають фетальне походження.

Вперше показано, що при культивуванні фракції моноклеарних клітин плаценти утворюються ПЕК. Така характеристика не є особливістю плацентарних ГСПК, оскільки ПЕК виявляються також при культивуванні ядровмісних клітин пуповинної крові, та «мобілізованої» периферичної крові в напівтвердому середовищі. В даній роботі вперше описано такий тип колоній. ПЕК складаються з клітин, що ростуть в одній площині та можуть утворювати один або декілька агрегатів на 14 добу культивування. ПЕК можуть досягати великих розмірів, що дозволяє вважати клітини, які їх утворюють, ранніми прогеніторами. 92% клітин ПЕК експресують CD235, що свідчить про приналежність колоній до еритроїдних. При підрахунку та класифікації колоній після культивування в напівтвердих середовищах, вірогідність їх появи в метилцелюлозо-вмісному середовищі достовірно нижче, ніж в агаровмісному середовищі і складає $2,5 \% \pm 1 \%$. Отже, ПЕК варто або виділяти в окрему групу, або, з огляду на низьку вірогідність їхньої

появи в метилцелюлозо-вмісному середовищі, відносити до BFU-E, оскільки вони утворені з ранніх еритроїдних прогеніторів.

Присутність лінійно-комітованих клітин 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 % [4].

Сукупність результатів наших експериментальних досліджень стосовно імунофенотипу ГСПК та їхнього колоніє-утворювального потенціалу та літературних даних [9, 16, 17] свідчить на користь уявлення про плаценту як активний гемопоетичний орган 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 $2,2 \times 10^6$ ($1,6 \times 10^6$ – $3,0 \times 10^6$) ГСПК за умови, якщо середня вага плаценти становить 540 г [159], кількість мононуклеарних клітин на 100 г тканини становить 1×10^8 [160], а кількість CD45⁺ клітин - 74 % серед усіх мононуклеарних клітин, ізольованих із плацентарної тканини [160]. Тож, одна плацента містить таку ж кількість ГСПК, як і зразки пуповинної крові. Так, показано, що середня загальна кількість клітин із фенотипом CD34⁺CD45⁺ в пуповинній крові (n = 300) становить $3,1 \times 10^6$ [161]. В інших роботах показано, що кількість CD34⁺CD45⁺ клітин варіює в межах $0,5$ – $2,6 \times 10^6$ для зразків пуповинної крові [162, 163]. У роботі Varsena A. 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 зразку зрілої плаценти [10].

Ми припускаємо, що використання ГСПК зрілої плаценти як додаткового джерела кровотворних клітин разом із ГСПК пуповинної крові дозволить усунути

недоліки трансплантації клітин пуповинної крові, пов'язані із малим їх вмістом та незрілістю прогеніторів. Так, нами показано, що плацентарні ГСПК *in situ* є більш комітованими в мієлоїдному та еритроїдному напрямках, ніж ГСПК пуповинної крові. Існують свідчення, що кількість комітованих клітин, а саме ранніх мієлоїдних ГСПК, є найточнішим показником загального обсягу колоніє-утворювальних клітин в алотрансплантатах. Їхній високий вміст в продуктах лейкаферезу після мобілізації G-CSF, у порівнянні із трансплантатами кісткового мозку і пуповинної крові, забезпечують швидкіше приживлення клітин після трансплантації [3, 164]. 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, оскільки мієлоїдно-комітовані ГСПК сприяють ранньому відновленню нейтрофілів і тромбоцитів, це дає певну можливість для примітивних ГСПК дозріти та вступити в гемопоез [132]. Є дані, що у фетальній печінці колоніє-утворювальні клітини із високим проліферативним потенціалом представляють собою ранні мієлоїдні попередники, і автори вважають, що стовбурові клітини містяться у фракції CD33⁺ клітин [22]. У популяції CD34⁺ клітин кісткового мозку спостерігається значно вищий вміст пізніх еритроїдних, пізніх мієлоїдних та В-лімфоїдних прогеніторів, ніж у пуповинній крові та продуктах лейкаферезу [132, 54]. Тим не менш, саме вміст CD34⁺CD38⁻ клітин є важливим параметром для прогнозування вдалого відновлення гемопоезу пацієнта після клітинної трансплантації [132]. Крім того, варто звернути увагу на те, що використання для трансплантації плацентарних ГСПК, які локалізовані безпосередньо у власній ніші разом із циркулювальними ГСПК пуповинної крові може мати велике значення в онкогематології.

Нами розроблено спосіб виділення ГСПК із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти, що дозволяє виділяти із розмороженої тканини життєздатні ГСПК. В основі такого способу є швидка ферментативна обробка тканини після кріоконсервування та розморожування із застосуванням лише одного ферменту – 0,1 % колагенази. Функціональна активність таких клітин була підтверджена клональним аналізом *in vitro*.

За нашими даними, ГСПК, виділені із кріоконсервованої плацентарної тканини, мають подібні властивості порівняно із ГСПК нативної тканини.

Проведені дослідження є підставою для створення низькотемпературних банків плацентарної тканини. Кріозбереження дозволяє забезпечити скринінг тканин плаценти та донорів на присутність трансмісивних інфекцій, наявність контамінацій бактеріями та грибами і відсутність вроджених та набутих патологічних процесів [14]. Можливість отримання із тканини як ММСК, так і ГСПК дозволяє розширити можливості застосування їх в клінічній практиці.

Таким чином, результати нашої роботи дають роз'яснення, чому плацента є важливою як додаткове джерело ГСПК разом із пуповинною кров'ю. В трьох відомих роботах [9, 16, 17], що розглядають плаценту як перспективне джерело ГСПК для медицини автори звертають увагу лише на те, що ГСПК плаценти можуть збільшити загальну кількість клітин пуповинної крові при трансплантаціях. В нашій роботі з'ясовано якісні та кількісні відмінності популяції ГСПК плацентарної тканини від ГСПК пуповинної крові, які можуть грати не менш важливу роль при застосуванні цих клітин у клінічній практиці.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримано результати порівняльного аналізу ГСПК плацентарної тканини, пуповинної крові та фетальної печінки, які свідчать про те, що в зрілій плаценті проходить активний гемопоез; і тому плацента може бути перспективним джерелом ГСПК для терапії онкогематологічних захворювань та вроджених порушень кровотворення не лише із точки зору додаткової кількості клітин, а й їхніх характеристик, які визначають функціональні властивості. Найбільш вагомими науковими та практичними результатами роботи сформульовано у наступних висновках:

1. Розроблено біотехнологічні підходи: модифіковано метод виділення функціонально активних ГСКП із зрілої тканини плаценти шляхом зменшення концентрації ферментів і розроблено спосіб виділення таких клітин із кріоконсервованої тканини плаценти шляхом швидкої ферментативної обробки.

2. Вперше встановлено, що серед ГСПК зрілої тканини плаценти достовірно вищий вміст мієлоїдних та еритроїдних прогеніторних клітин у порівнянні з такими пуповинної крові, однак нижчий вміст мієлоїдних та лімфоїдних прогеніторних клітин у порівнянні із ГСПК фетальної печінки.

3. Вперше показано, що ГСПК із тканини зрілої та фетальної плаценти характеризуються більшою фенотиповою гетерогенністю, ніж ГСПК пуповинної крові та фетальної печінки.

4. Показано, що ГСПК зрілої плацентарної тканини та пуповинної крові мають подібний потенціал до мультилінійного диференціювання *in vitro* та однакове співвідношення мієлоїдних та еритроїдних прогеніторів серед усіх комітованих клітин-попередників.

5. Вперше виявлено такі особливості імунофенотипу ГСПК плацентарної тканини порівняно з відповідними клітинами пуповинної крові: експресія CD90 на більш високому рівні і наявність субпопуляції із високою інтенсивністю експресії CD31; при цьому спостерігається подібний рівень експресії CD133.

6. Вперше виявлено та описано новий тип колоній – ПЕК, які утворюються з ранніх еритроїдних прогеніторів і виявляються при культивуванні ядровмісних клітин пуповинної крові, плаценти та «мобілізованої» периферичної крові в напівтвердих середовищах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Verfaillie C.M. Hematopoietic stem cells for transplantation / Verfaillie C.M. // Nature Immunology. – 2002. – Vol. 3. – №3. – P. 14–317.
2. Cheuk D K.L. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies / Cheuk D K.L. // World Journal of Transplantation. – 2013. – Vol. 3. – №4. – P. 99–112.
3. Broxmeyer H.E. Background and future considerations for human cord blood hematopoietic cell transplantation, including economic concerns / Broxmeyer H.E., Farag S. // Stem Cells and Development. – 2013. – Vol. 22. – №1. – P. 103–110.
4. Грищенко В.И. Гемопоетические клетки эмбриональной печени / Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Шерешков С.И. // Наукова Думка Киев. – 1988. – С. 1–192.
5. Golfier F. Mid-trimester fetal livers are a rich source of CD34^{+/++} cells for transplantation / Golfier F., Bárcena A., Cruz J., Harrison M., Muench M. // Bone Marrow Transplantation. – 1999. – Vol. – № 245. – P. 451–461.
6. Touraine J.L. Treatment of human fetuses and induction of immunological tolerance in humans by *in utero* transplantation of stem cells into fetal recipients / Touraine J.L. // Acta Haematologica. – 1996. – № 96. – P. 115–119.
7. Touraine J.L. Fetal liver transplantation: biology and clinical results / Touraine J.L., Roncarolo M.G., Bacchetta R., Raudrant D., Rebaud A., Laplace S., Cesbron P., Gebuhrer L., Zobot M.T., Touraine F. // Bone Marrow Transplant. – 1993.–Vol. 11. – № 1. – P. 119–122.

8. Bárcena A. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development / Bárcena A., Kapidzic M., Muench M.O., Gormley M., Scott M.A., Weier J.F., Ferlatte C., Fisher S.J. // *Developmental Biology*. – 2009. – Vol. 327. – № 1. – P. 24–33.
9. Serikov V. Human Term Placenta as a Source of Hematopoietic Cells / Serikov V., Hounshell C., Larkin S., Green W., Ikeda H., Walters M.C., Kuypers F.A. // *Exp Biol Med*. – 2009. – Vol. 234. – №. 7. – P. 813–823.
10. Bárcena A. Human placenta and chorion: potential additional sources of hematopoietic stem cells for transplantation / Bárcena A., Muench M.O., Kapidzic M., Gormley M., Goldfien G.A., Fisher S.J. // *Transfusion*. – 2011. – Vol. 51. – №. 4. – P. 94S–105S.
11. Пат. UA 67620. Спосіб виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин / Винахідники Лобинцева Г. С., Шаблій В. А., Кучма М. Д.; Власник Товариство з обмеженою відповідальністю Інститут клітинної терапії. – № u 201111561; заявл. 30.09.2011; опубл. 27.02.2012, Бюл. № 4.
12. Шаблій В.А. Фенотип і міграційний потенціал мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти людини/ Шаблій В.А., Кучма М., Кирик В. та ін. // *Біотехнологія*. – 2012. – Т. 5, № 5. – С.34 – 44.
13. Шаблій В.А. Мезенхимальные стромальные клетки из нативной и кріоконсервированной плаценты человека: фенотип, мультипотентность и миграционный потенциал *in vivo*/ Шаблій В.А., Кучма М.Д., Кирик В.М. та ін. // *Проблемы криобиологии*. – 2012. – Т.22, №2. – С. 157 – 160.
14. 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» – В. А. Шаблій. – Київ, 2013. – 24 с.

15. Sergei Doulatov Hematopoiesis: A Human Perspective / Sergei Doulatov, Faiyaz Notta¹, Elisa Laurenti¹, John E. Dick // Cell Stem Cell. – 2012. – Vol. 10. – №.2,3 – P. 120–136.
16. Challier J.C. Immunocytological evidence for hematopoiesis in the early human placenta / Challier J.C., Galtier M., Cortez A., Bintein T., Rabreau M., Uzan S. // Placenta. – 2005. – Vol. 26. – №. 4. – P. 282–288.
17. Bárcena A. A New Role for the Human Placenta as a Hematopoietic Site Throughout Gestation / A. Bárcena, M. O.Muench, M. Kapidzic // Reprod Sci. – 2009. – Vol. 16. – №. 2. – P. 178–187.
18. Robin C. Human Placenta Is a Potent Hematopoietic Niche Containing Hematopoietic Stem and Progenitor Cells throughout Development / C. Robin, K. Bollerot, S. Mendes // Cell Stem Cell. – 2009. – Vol. 5. – №.4. – P. 385–395.
19. Куртова А.В. Количественный учет 34^{+} гемопоэтических стволовых клеток в пуповинной крови / Куртова А.В., Зуева Е.Е. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. –2006. – Т. 1. – №.1. – С. 66–71.
20. Altin J.G. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation / Altin J.G., Sloan E.K. // Immunol Cell Biol. – 1997. – Vol. 75. – №.5. – С. 430–445.
21. Issaad C. A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human $CD34^{++}CD38^{-}$ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays / Issaad C., Croisille L., Katz A., Vainchenker W., Coulombel L. // Blood. – 1993. – Vol. 81. – №.5. – P. 2916–2924.

22. Terstappen L.W. Sequential generation of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells / Terstappen L.W, Huang S., Safford M., Lansdorp P.M., Loken M.R. // *Blood*. – 1991. – Vol. 77. – P. 1218–1227.
23. Muench M.O. Expression of CD33, CD38, and HLA-DR on CD34⁺ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential / Muench M.O., Cupp J., Polakoff J., Roncarolo M.G. // *Blood*. – 1994. – Vol. 83. – P. 3170–3181.
24. Steen R. 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 / Steen R, Tjonnfjord GE, Egeland T. // *J Hematother*. – 1994. – Vol. 3. – №.4. – P. 253–262.
25. Hogan C.J. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34⁺ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice / Hogan CJ, Shpall EJ, Keller G. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. – Vol. 99. – №.1. – P. 413–418.
26. Zanjani E.D. Engraftment and multilineage expression of human bone marrow CD34⁺ cells *in vivo* / Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Livingston A.G., Porada C.D., Ogawa M. // *Ann N Y Acad Sci*. – 1999. – №.872. – P. 220–231.
27. Yin A.H. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells / Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A.G., Olweus J., Kearney J., Buck D.W. // *Blood*. – 1997. – Vol. 90. – №.12. – P. 5002–5012.
28. Toren A. CD133-positive hematopoietic stem cell "stemness" genes contain many genes mutated or abnormally expressed in leukemia / Toren A., Bielgorai B., Jacob-Hirsch J., Fisher T., Kreiser D., Moran O., Zeligson S., Givol D., Yitzhaky A.,

- Itskovitz-Eldor J., Kventsel I., Rosenthal E., Amariglio N., Rechavia G. // *Stem Cells*. – 2005. – Vol. 23. – №.8. – P. 1142–1153.
29. Wynter E.A. CD34⁺AC133⁺ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors / de Wynter E.A., Buck D., Hart C., Heywood R., Coutinho L.H., Clayton A., Rafferty J.A., Burt D., Guenechea G., Bueren J.A., Gagen D., Fairbairn L.J., Lord B.I., Testa N.G. // *Stem Cells*. – 1998. – Vol. 16. – №.6. – P. 387–396.
30. Mayani H. Thy-1 Expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood / Mayani H., Lansdorp P.M. // *Blood*. – 1994. – Vol. 83. – №.9. – P. 2410–2417.
31. Majeti R. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood / Majeti R., Park C.Y., Weissman I.L. // *Cell Stem Cell*. – 2007. – №.131. – P. 635–645.
32. Baum C.M. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population / Baum C.M., Weissman I.L., Tsukamoto A.S., Buckle A.M., Peault B. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1992. – Vol. 89. – №.7. – P. 2804–2808.
33. Murray L. Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34⁺ Thy-1⁺ Lin-subpopulation from mobilized peripheral blood / Murray L., Chen B., Galy A., Chen S., Tushinski R., Uchida N., Negrin R., Tricot G., Jagannath S., Vesole D. // *Blood*. – 1995. – №.85. – P. 368–378.
34. Labastie M.C. Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo / Labastie M.C., Cortés F., Roméo P.H., Dulac C., Péault B. // *Blood*. – 1998. – Vol. 92. – №.10. – P. 3624–3635.

35. Watt S.M. The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34⁺ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes / Watt S.M., Williamson J., Genevier H., Fawcett J., Simmons D.L., Hatzfeld A., Nesbitt S.A., Coombe D.R. // *Blood*. – 1993. – Vol. 82. – №.9. – P. 2649–2663.
36. Pawelec G. Dissection of human allostimulatory determinants with cloned T cells: stimulation inhibition by monoclonal antibodies TÛ22, 34, 36, 37, 39, 43, and 58 against distinct human MHC class II molecules / Pawelec G., Ziegler A., Wernet P. // *Human Immunology*. – 1985. – Vol. 12. – №.3. – P. 165–176.
37. Ziegler A. Analysis by sequential immunoprecipitations of the specificities of the monoclonal antibodies TÛ22, 34, 35, 36, 37, 39, 43, 58, and YD1/63.HLK directed against human HLA class II antigens / Ziegler A., Heinig J., Müller C., Götz H., Thinnes F.P., Uchanska-Ziegler B., Wernet P. // *Immunobiology*. – 1986. – Vol. 171. – №.1–2. – P. 77–92.
38. Marquez C. Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells / Marquez C., Trigueros C., Franco J. M., Ramiro A. R., Carrasco Y. R., Lo´pez-Botet M., Toribio M. L. // *Blood*. – 1998. – Vol. 91. – №.8. – P. 27605–2771.
39. Hernandez-Caselles T. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing / Hernandez-Caselles T., Martı´nez-Esparza M., Pe´rez-Oliva A.B., Quintanilla-Cecconi A.M., Garcı´a-Alonso A, Rocıo Alvarez-Lo´pez D. M. // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2006. – Vol. 79. – №.1. – P. 46–58.
40. Terstappen L.W. Quantitative Comparison of Myeloid Antigens on Five Lineages of Mature Peripheral Blood Cells / Terstappen L.W., Hollander Z., Meiners H., Loken M.R. // *Journal of Leukocyte Biology*. – 1990. – Vol. 48. – №.2. – P. 138–148.

41. Antal-Szalmas P. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils / Antal-Szalmas P., Strijp J.A., Weersink A.J., Verhoef J., Van Kessel K.P. // *J. Leukoc Biol.* – 1997. – Vol. 61. – №.6. – P. 721–728.
42. Prokopovych S.K. Dendritic cells and prospects of their use in immunotherapy of cancer / Prokopovych S.K., Vinnitzkiy S.K. // *Oncology.* – 2001. – Vol. 3. – №.2-3. – P. 126–131.
43. Lathers D.M. Dendritic cell differentiation pathways of CD34+ cells from the peripheral blood of head and neck cancer patients / Lathers D.M., Lubbers E., Wright M.A., Young M.R. // *Journal of Leukocyte Biology.* – 1999. – Vol. 65. – №.5. – P. 623–628.
44. Perez S.A. A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood / Perez S.A., Sotiropoulou P.A., Gkika D.G., Mahaira L.G., Niarchos D.K., Gritzapis A.D., Kavalakis Y.G., Antsaklis A.I., Baxevanis C.N., Papamichail M. // *Blood.* – 2003. – Vol. 101. – №.9. – P. 3444–3450.
45. Haynes B.F. Ontogeny of T-cell precursors: A model for the initial stages of human T-cell development / Haynes B.F., Denning S.M., Singer K.H., Kurtzberg J. // *Immunol. Today.* – 1989. – Vol. 10. – №.3. – P. 87–91.
46. Bárcena A. Tracing the expression of CD7 and other antigens during T- and myeloid-cell differentiation in the human fetal liver and thymus / Bárcena A., Muench M.O., Roncarolo M.G., Spits H. // *Leuk Lymphoma.* – 1995. – Vol. 17. – №.1–2. – P. 1–11
47. Chabannon C. Expression of CD7 on normal human myeloid progenitors / Chabannon C., Wood P., Torok-Storb B. // *The Journal of Immunology.* – 1992. – Vol. 149. – №.6. – P. 2110–2113.

48. Carvalho J.M., Souza M.K., Buccheri V. et al. 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). – P. 12–8.
49. Miller J.S. 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 / Carvalho J.M., Souza M.K., Buccheri V., Rubens C.V., Kerbaux J., Oliveira J.S. // Blood. – 1994. – Vol. 83. – №.9. – P. 2594–2601.
50. Grümayer E.R. Identification of Novel B-Lineage Cells in Human Fetal Bone Marrow That Coexpress CD7 / Grümayer E.R., Griesinger F., Hummell D.S., Brunning R.D., Kersey J.H. // Blood. – 1991. – Vol. 77. – №.1. – P. 64–68.
51. Schmitt C. CD34-expressing human thymocyte precursors proliferate in response to interleukin-7 but have lost myeloid differentiation potential / Schmitt C., Ktorza S., Sarun S., Blanc C., De Jong R., Debre P. // Blood. – 1993. – Vol. 82. – №.12. – P. 3675–3685.
52. Fritsch G. The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood / Fritsch G., Stimpfl M., Kurz M., Printz D., Buchinger P., Fischmeister G., Hoecker P., Gadner H. // Bone Marrow Transplant. – 1996. – Vol. 17. – №.2. – P. 169–178.
53. Thoma S.J. Phenotype analysis of hematopoietic CD34⁺ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction / Thoma S.J., Lamping C.P., Ziegler B.L // Blood. – 1994. – Vol. 83. – №.8. – P. 2103–2114.
54. Kinniburgh D. Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow / Kinniburgh D., Russell N.H. // Bone Marrow Transplant. – 1993. – Vol. 12. – №.5. – P. 489–494

55. De Bruyn C. Comparison of the coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR antigens on CD34⁺ purified cells from human cord blood and bone marrow / De Bruyn C., Delforge A., Bron D., Bernier M., Massy M., Ley P., de Hemptinne D., Stryckmans P. // *Stem Cells*. – 1995. – Vol. 13. – №.3. – P. 281–288.
56. Bender J.G. 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 / Bender J.G., Unverzagt K., Walker D.E., Lee W., Smith S., Williams S., Van Epps D.E. // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1994. – Vol. 70. – №.1. – P. 10–18.
57. Sperling C. Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias / Sperling C., Schwartz S., Büchner T., Thiel E., Ludwig W. D. // *Haematologica*. – 1997. – №.82. – P. 617—621.
58. Escribano L., Ocqueteau M., Almeida J., Orfao A., San Miguel J. F. Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis / Escribano L., Ocqueteau M., Almeida J., Orfao A., San Miguel J. F. // *Leuk. Lymphoma*. – 1998. – №.30. – P. 459—466.
59. Loken M.R. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development / Loken M.R., Shah V.O., Dattilio K.L., Civin C.I. // *Blood*. – 1987. – Vol. 6. – №.1. – P. 255–263.
60. Klimchenko O. A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis / Klimchenko O., Mori M., Distefano A., Langlois T., Larbret F., Lecluse Y., Feraud O., Vainchenker W., Norol F., Debili N. // *Blood*. – 2009. – Vol. 114. – №.8. – P. 1506–1517.

61. Van Handel B. The first trimester human placenta is a site for full terminal maturation of primitive erythroid cells / Van Handel B., Prashad S.L., Hassanzadeh-Kiabi N., Huang A., Magnusson M., Atanassova B., Chen A., Hamalainen E.I., Mikkola H.K. // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – №.17. – P. 3321–3330.
62. Brocklebank A.M. Enumeration of CD34⁺ Cells in Cord Blood: A Variation on a Single-Platform Flow Cytometric Method Based on the ISHAGE Gating Strategy / Brocklebank A.M., Sparrow R.L. // *Cytometry*. – 2001. – Vol. 46. – №.4. – P. 254-261.
63. Pranke P. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34⁺ and CD34⁺ bright cells using the ProCountTM-BD and ISHAGE protocols / Pranke P., Hendrikx J., Alespeiti G., Nardi N., Rubinstein P., Visser J. // *Braz J Med Biol Res*. – 2006. – Vol. 39. – №.7. – P. 901-906.
64. Traycoff C.M. Evaluation of the *in vitro* behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells / Traycoff C.M., Abboud M.R., Laver J., Brandt J.E., Hoffman R., Law P., Ishizawa L., Srour E.F. // *Exp Hematol*. – 1994. – Vol. 22. – №.2. – P. 215-222.
65. Caux C. Sequential loss of CD34 and class II MHC antigens on purified cord blood hematopoietic progenitors cultured with IL-3: characterization of CD34⁺, HLA-DR⁺ cells / Caux C., Favre C., Saeland S., Duvert V., Mannoni P., Durand I., Aubry J.P., de Vries J.E. // *Blood*. – 1989. – Vol. 74. – №.4. – P. 1287–1294.
66. Cardoso A.A. Release from quiescence of CD34⁺CD38⁻ human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults / Cardoso A.A., Li M.L., Batard P., Hatzfeld A., Brown E.L., Levesque J.P., Sookdeo H., Panterne B., Sansilvestri P., Clark S.C. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1993. – Vol. 90. – №.18. – P. 8707–8711.

67. Sutherland H.J. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro* / Sutherland H.J., Eaves C.J., Eaves A.C., Dragowska W., Lansdorp P.M. // *Blood*. – 1989. – Vol. 74. – №.5. – P. 1563–1569.
68. Verfaillie C. Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term *in vitro* repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma / Verfaillie C., Blakolmer K., McGlave P. // *J Exp Med*. – 1990. – Vol. 172. – №.2. – P. 509–517.
69. DiGiusto D. Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34 / DiGiusto D., Chen S., Combs J., Webb S., Namikawa R., Tsukamoto A., Chen B.P., Galy A.H. // *Blood*. – 1994. – Vol. 84. – №.2. – P. 421–432.
70. Huang S., Terstappen L.W. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells / Huang S., Terstappen L.W. // *Nature*. – 1992. – Vol. 360. – №.6406. – P. 745–749.
71. Saeland S. Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34⁺ hematopoietic cells / Saeland S., Duvert V., Caux C., Pandrau D., Favre C., Vallé A., Durand I., Charbord P., de Vries J., Banchereau J. // *Exp Hematol*. – 1992. – Vol. 20. – №.1. – P. 24–33.
72. Olweus J. CD64/IFcγRI Is a Granulo-monocytic Lineage Marker on CD34 Hematopoietic Progenitor Cells / Olweus J., Lund-Johansen F., Terstappen L. // *Blood*. – 1995. – Vol. 85. – №.9. – P. 2402–2413.
73. 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. – Vol. 108. – №.9. – P. 2897–905.

74. Marsee D.K. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens / Marsee D.K., Pinkus G.S., Yu H. // *Am J Clin Pathol.* – 2010. – Vol. 134. – №.3. – P. 429–435.
75. Mayani H. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells / Mayani H., Dragowska W., Lansdorp P.M. // *Blood.* – 1993. – Vol. 81. – №.12. – P. 3252–3258.
76. Mayani H. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines / Mayani H., Dragowska W., Lansdorp P.M. // *Blood.* – 1993. – Vol. 82. – №.9. – P. 2664–2672.
77. Yarden Y. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand / Yarden Y., Kuang W.J., Yang-Feng T., Coussens L., Munemitsu S., Dull T.J., Chen E., Schlessinger J., Francke U., Ullrich A. // *EMBO J.* – 1987. – Vol. 6. – №.11. – P. 3341–3348.
78. Berardi A.C. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells / Berardi A.C., Wang A., Levine J.D., Lopez P., Scadden D.T. // *Science.* – 1995. – Vol. 6. – №.267. – P. 104–108.
79. Anderson D.M. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hemopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms / Anderson D.M., Lyman S.D., Baird A., Wignall J.M., Eisenman J., Rauch C., March C.J., Boswell H.S., Gimpel S.D., Cosman D. // *Cell.* – 1990. – Vol. 63. – №.1. – P. 235–242.
80. Craig W. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells / Craig W., Kay R., Cutler R.L., Lansdorp P.M. // *J Exp Med.* – 1993. – Vol. 177. – №.5. – P. 1331–1338.

81. Rappold I. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase / 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. // *Blood*. – 1997. – Vol. 90. – №.1. – P. 111–125.
82. Johnson L.V. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine-123 / Johnson L.V., Walsh M.L., Chen L.B. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1980. – Vol. 77. – №.2. – P. 990–994.
83. Cicuttini F.M. The effect of cytokines on CD34⁺ Rh-123high and low progenitor cells from human umbilical cord blood / Cicuttini F.M., Welch K.L., Boyd A.W. // *Exp Hematol*. – 1994. – Vol. 22. – №.13. – P. 1244–1251.
84. Bühring H. J. CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin / Bühring H. J., Kuçi S., Conze T., Rathke G., Bartolovic K., Grünebach F., Scherl-Mostageer M., Brümmendorf T. H., Schweifer N., Lammers R. // *Stem Cells*. – 2004. – Vol. 22. – №.3. – P. 334–343.
85. Bühring H. J. Expression of novel surface antigens on early hematopoietic cells / Bühring H. J., Seiffert M., Bock T.A., Scheduling S., Thiel A., Scheffold A., Kanz L., Brugger W. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 30. – №.872. – P. 25–38.
86. Haeryfar S. M. Thy-1: more than a mouse Pan-T cell marker / Haeryfar S. M., Hoskin D. W. // *J. Immunol*. – 2004. – Vol. 173. – №.6. – P. 3581–3588.
87. D’Arena G. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells / D’Arena G., Musto P., Cascavilla N., Di Giorgio G., Zendo- li F., Carotenuto M. // *Haematologica*. – 1996. – Vol. 81. – №.5. – P. 404–409.

88. Bhatia M. A newly discovered class of human haemopoietic cells with SCID-repopulating activity / Bhatia M., Bonnet D., Murdoch B., Gan O. I., Dick J. E. // Nat. Med. – 1998. – Vol. 4. – №.9. – P. 1038–1045.
89. Gallacher L. Isolation and characterization of human CD34⁻LIN⁻ and CD34⁺LIN⁻ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7 / Gallacher L., Murdoch B., Wu D. M., Karanu F. N., Keeney M., Bhatia M. // Blood. – 2000. – Vol. 95. – №.9. – P. 2813–2820.
90. Rutella S. Identification of a novel subpopulation of human cord blood CD34⁻CD133⁻CD7⁻CD45⁺ lineage-cells capable of lymphoid/NK cell differentiation after in vitro exposure to IL-15 / Rutella S., Bonanno G., Marone M., de Ritis D., Mariotti A., Voso M. T., Scambia G., Mancuso S., Leone G., Pierelli L. // J. Immunol. – 2003. – Vol. 171. – №.6. – P. 2977–2988.
91. Zanjani E. D. Human bone marrow CD34⁻ cells engraft *in vivo* and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells / Zanjani E. D., Almeida-Porada G., Livingston A. G., Flake A. W., Ogawa M. // Exp. Hematol. – 1998. – Vol. 26. – №.4. – P. 353–360.
92. Giebel B. Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells / Giebel B., Punzel M. // Biol. Chem. – 2008. – Vol. 389. – №.7. – P. 813–824.
93. Sakabe H. Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived CD34⁺ cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38 and c-kit antigens / Sakabe H., Ohmizono Y., Tanimukai S., Kimura T., Mori K. J., Abe T., Sonoda Y. // Stem Cells. – 1997. – Vol. 15. – №.1. – P. 73–81.
94. Пантелеев А.В. Сравнение экспрессии ранних маркеров в пуповинной крови и заготовках мобилизированной крови / Пантелеев А.В., Воробьев И.А. // Цитология. – 2012. – Т. 54. – №.10. – P. 774–782.

95. Saeland S. Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34⁺ hematopoietic cells / Saeland S., Duvert V., Caux C., Pandrau D., Favre C., Vallé A., Durand I., Charbord P., de Vries J., Banchereau J. // *Exp Hematol.* – 1992. – Vol. 20. – №.1. – P. 24–33.
96. Rabian-Herzog C. Characterization of lymphocyte subpopulation in cord blood / Rabian-Herzog C, Lesage S, Gluckman E. // *Bone Marrow Transplant.* – 1992. – Vol. 9. – №. S1. – P. 64–67.
97. Kaplan D. CD5 expression by B lymphocytes and its regulation upon Epstein–Barr virus transformation / Kaplan D., Smith D., Meyerson H., Pecora N., Lewandowska K. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2001. – Vol. 98. – №. 24. – P. 13850–13853.
98. Hardy R.R. Distinctive developmental origins and specificities of the CD5⁺ B-cell subset / Hardy R.R., Li Y-S, Hayakawa K. // *Sem Immunol.* – 1996. – Vol. 8. – №. 1. – P. 37–44
99. Stall A.M. Introduction: B-1 cells: origin and function / Stall A.M., Wells S.M. // *Academic Press: Cambridge, UK.* – 1996. – P. 1–2.
100. Ezsi R. Reactivity of peripheral blood, cord blood and B-CLL cells with the workshop unclustered B cell panel antibodies / Ezsi R., Demeter J., Valent S., Paulin F., Milosevits J., Farkas P., Szigetvari C.S., Varadi E., Batai A., Karadi A., Paloczi K. // *Tiss Antigen.* – 1996. – Vol. 48. – P. 372.
101. Ezsi R. Immunophenotypes of cord blood B1a and B1b lymphocytes / Ezsi R., Valent S., Paulin F., Kotlan B., Pocsik E., Petranyi G., Paloczi K. // *J Mol Med.* – 1997. – Vol. 75. – P. 187
102. Paloczi K. Immunophenotypic and functional characterization of human umbilical cord blood mononuclear cells / Paloczi K. // *Leukemia.* – 1999. – Vol. 13. – №. 1. – P. 87–89.

103. Milosevits J. Immunophenotypi and functional characteristics of haemopoietic cells from human cord blood / Milosevits J., Pocsik E., Schmidt B., Remenyi P., Intodi Z.S., Reti M., Batai A., Illes P., Mihalik R., Petranyi G.G., Paloczi K. // Scand J Immunol. – 1995. – Vol. 42. – №. 1. – P. 493–500.
104. Lu L. Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application / Lu L., Shen R-N, Broxmeyer H.E. // Crit Rev Oncol/Hematol. – 1996. – Vol. 22. – №. 2. – P. 61–78. .
105. Muench M.O. Phenotypic and functional evidence for the expression of CD4 by hematopoietic stem cells isolated from human fetal liver / Muench M.O., Roncarolo M.G., Namikawa R. // Blood. – 1997. – Vol. 89. – №. 4. – P. 1364–1375.
106. Rabian-Herzog C. Characterization of lymphocyte subpopulation in cord blood / Rabian-Herzog C., Lesage S., Gluckman E., Charron D. // Bone Marrow Transplant. – 1992. – Vol. 2. – №. 2. – P. 255–257.
107. Phillips J.H. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolyti function and express cytoplasmic CD3 epsilon, delta proteins / Phillips J.H., Hori T., Nagler A., Bhat N., Spits H., Lanier L.L. // J Exp Med. – 1992. – Vol. 175. – №. 4. – P. 1055–1066.
108. Gaddy J. Cord blood natural killer cell are functionally and phenotypically immature but readily respond to IL-2 and IL-12 / Gaddy J., Risdon G., Broxmeyer H.E. // J Interfer Cytok Res. – 1995. – Vol. 15. – №. 6. – P. 527–536.
109. Riemann D. Demonstration of CD13/aminopeptidase Non synovial fluid T cells from patients with different forms of joint effusions / Riemann D., Schwachula A., Hentschel M., Langner J. // Immunobiology. – 1993. – Vol. 187. – №.1-2. – P. 24–35.

110. Okumura N. Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors / Okumura N., Tsuji K., Nakahata T. // *Blood*. – 1992. – Vol. 80. – №. 3. – P. 642–650.
111. Testa U. CD123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies / Testa U., Pelosi E., Frankel A. // *Biomark Res*. – 2014. – Vol. 2. – №. 1. – P. 2–4.
112. Gilles J.M. Immunophenotypic characterization of human fetal liver hematopoietic stem cells during the midtrimester of gestation / Gilles J.M., Divon M.Y., Bentolila E., Rotenberg O.D., Gebhard D.F., Rashbaum W.K., Lyman W.D. // *Am J Obstet Gynecol*. – 1997. – Vol. 177. – №. 3. – P. 619–625.
113. Nava S. Characterization of cells in the developing human liver / / Nava S., Westgren M., Jaksch M., Tibell A., Broomé U., Ericzon B.G., Sumitran-Holgersson S. // *Differentiation*. – 2005. – Vol. 73. – №. 5. – P. 249–260.
114. Roy V. Phenotypic and functional characterization of committed and primitive myeloid and lymphoid hematopoietic precursors in human fetal liver / Roy V., Miller J.S., Verfaillie C.M. // *Exp Hematol*. – 1997. – Vol. 25. – №. 5. – P. 387–394.
115. Winchester R.J. Expression of Ia-like antigen molecules on human granulocytes during early phases of differentiation / Winchester R.J., Ross G.D., Jarowski C., Wang C.Y., Halper J., Broxmeyer H.E. // *Proc Natl Acad*. – 1977. – Vol. 74. – №. 9. – P. 4012–4016.
116. Fitch J.H. Monoclonal antibodies to HLA-A, B and Ia-like antigens inhibit colony formation by human myeloid progenitor cells / Fitch J.H., Ferrone S., Quaranta V., Molinaro G.A., Cline M.J. // *J Immunol*. – 1980. – Vol. 125. – P. 2004–2008.

117. Robinson J. Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation / Robinson J., Sieff C., Delia D., Edwards P.A., Greaves M. // *Nature*. – 1981. – Vol. 289. – №. 5793. – P. 68–71.
118. Pelus L.M. Expression of Ia-antigens on normal and chronic myeloid leukemic human granulocyte-macrophage colony-forming cells (CFU-GM) is associated with the regulation of cell proliferation by prostaglandin E / Pelus L.M., Saletan S., Silver R.T., Moore M.A. // *Blood*. – 1982. – Vol. 59. – №.2. – P. 284–292
119. Griffin J.D. Isolation of myeloid progenitor cells from peripheral blood of chronic myelogenous leukemia patients / Griffin J.D., Beveridge R.P., Schlossman S.F. // *Blood*. – 1982. – Vol. 60. – №.1. – P. 30–37.
120. Koizumi S. Expression of Ia-like antigens defined by monoclonal OKIa1 antibody on hemopoietic progenitor cells in cord blood: A comparison with human bone marrow / Koizumi S., Yamagami M., Miura M., Horita S., Sano M., Ikuta N., Taniguchi N. // *Blood*. – 1982. – Vol. 60. – №.4. – P. 1046–1049.
121. Fitchen J.H. Expression of Ia-like HLA-A. B antigens on human multipotential hematopoietic progenitor cells / Fitchen J.H., Le Fevre C., Ferrone S., Cline M.J. // *Blood*. – 1982. – Vol. 59. – №.1. – P. 188–190.
122. Andrews R.G. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties / Andrews R.G., Singer J.W., Bernstein I.D. // *J Exp Med*. – 1989. – Vol. 169. – №.5. – P. 1721–1731.
123. La Russa V.F. Effects of anti-CD33 blocked ricin immunotoxin on the capacity of CD34⁺ human marrow cells to establish *in vitro* hematopoiesis in long-term marrow cultures / La Russa V.F., Giffin J.D., Kessler S.W., Cutting M.A., Knight R.D.,

- Blattler W.A., Lambert J.M., Wright D.G. // *Exp Hematol.* – 1992. – Vol. 20. – №.4. – P. 442–448.
124. Shipp M.A. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: Cutting is the key! / Shipp M.A., Look A.T. // *Blood.* –
125. Ema H. Colony formation of clone-sorted human hematopoietic progenitors / Ema H., Suda T., Miura Y., Nakauchi H. // *Blood.* – 1990. – Vol. 75. – №.10. – P. 1941–1946.
126. Robertson M.J. Human bone marrow depleted of CD33-positive cells mediates delayed but durable reconstitution of hematopoiesis: Clinical trial of MY9 monoclonal antibody purged autografts for the treatment of acute myeloid leukemia / Robertson M.J., Soiffer R.J., Freedman A.S., Rabinowe S.L., Anderson K.C., Ervin T.J., Murray C., Dear K., Griffin J.D., Nadler L.M., Ritz J. // *Blood.* – 1992. – Vol. 79. – №.9. – P. 2229–2236.
127. Litzow M.R. Proliferative responses to interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor distinguish a minor subpopulation of CD34-positive marrow progenitors that do not express CD33 and a novel antigen / Litzow M.R., Brashem-Stein C., Andrews R.G., Bernstein I.D. // *Blood.* – 1991. – Vol. 77. – №.11. – P. 2229–2359.
128. Muench M.O. Broad Distribution of Colony-Forming Cells with Erythroid, Myeloid, Dendritic Cell, and NK Cell Potential Among CD34 Fetal Liver Cells / Muench M.O., Bárcena A. // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – №.9. – P. 4902–4909.
129. Papayannopoulou T. Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: Functional properties and composite antigenic profile / Papayannopoulou T., Brice M., Broudy V.C., Zsebo K.M. // *Blood.* – 1991. – Vol. 78. – №.6. – P. 1403–1412.

130. Reisbach G. Characterization of hemopoietic cell populations from human cord blood expressing c-kit / Reisbach G., Bartke I., Kempkes B., Kostka G., Ellwart J., Birner A., Thalmeier K., Mailhammer R., Bornkamm G.W., Ullrich A., Dormer P. // *Exp Hematol.* – 1993. – Vol. 21. – №.1. – P. 74–79.
131. Sarma N. J. Colony Forming Cell (CFC) Assay for Human Hematopoietic Cells / Sarma N. J., Takeda A., Yaseen N. R. // *Journal of Visualized Experiments.* – 2010. – Vol. 46. –P. 2195.
132. Theilgaard-Mönch K. Pluripotent and myeloid-committed CD34⁺ subsets in hematopoietic stem cell allografts / Theilgaard-Mönch K., Raaschou-Jensen K., Schjødt K., Heilmann C., Vindeløv L., Jacobsen N., Dickmeiss E. // *Bone Marrow Transplant.* – 2003. – Vol. 32. – №.12. – P. 1125–1133.
133. Huang S. Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood vs. adult bone marrow and mobilized peripheral blood / Huang S., Law P., Young D., Ho A.D. // *Exp Hematol.* – 1998. – Vol. 26. – №.12. – P. 1162–1171.
134. Пат. UA 46673 А. Спосіб консервування гемопоетичних клітин людини / Винахідник Лобинцева Г.С. – заявл. 14.01.2002; опубл. 15.05.2002, Бюл. №5.
135. Nissen-Druey C. Human hematopoietic colonies in health and disease / Nissen-Druey C., Tichelli A., Meyer-Monard S. // *Acta Haematologica.* – 2005. – Vol. 113. – №.1. – P. 5–96.
136. Abuzakouk M. Collagenase and Dispase enzymes disrupt lymphocyte surface molecules / Abuzakouk M., Feigherym C., O'Farrelly C. // *Journal of Immunological Methods.* – 1996. – Vol. 194. – №.2. – P. 211–216.
137. Gratama J.W. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. / Gratama J.W., Orfao A., Barnett D., Brando B., Huber A., Janossy G., Johnsen H.E., Keeney M.,

- Marti G.E., Preijers F., Rothe G., Serke S., Sutherland D.R., Van der Schoot C.E., Schmitz G., Papa S. // *Cytometry*. – 1998. – Vol. 34. – №.3. – P. 128–142.
138. Siena S. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients / Siena S., Bregni M., Brando B, Belli N., Ravagnani F., Gandola L., Stern A.C., Lansdorp P.M., Bonadonna G., Gianni A.M. // *Blood*. – 1991. – Vol. 77. – №.2. – P. 400–409.
139. Sutherland D.R. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry / Sutherland D.R., Anderson L., Keeney M., Nayar R., Chin-Yee I. // *J Hematother*. – 1996. – Vol. 5. – №.3. – P. 213–226.
140. Sutherland D.R. Sensitive detection and enumeration of CD34⁺ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry / Sutherland D.R., Keating A., Nayar R., Anania S., Stewart A.K. // *Exp Hematol*. – 1994. – Vol. 22. – №.10. – P. 1003–1010.
141. van Lochem E.G. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts / van Lochem E.G., van der Velden V.H., Wind H.K., te Marvelde J.G., Westerdaal N.A., van Dongen J.J. *Cytometry B*. // *Clin Cytom*. – 2004. – Vol. 60. – №.1. – P. 1–13.
142. Gajkowska A. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods / Gajkowska A., Oldak T., Jastrzevska M, Machaj E.K., Walewski J., Kraszewska E., Pojda Z. // *Folia Histochem Cytobiol*. – 2006. – Vol. 44. – №.1. – P. 53–60.
143. Serke S. Selective susceptibility of CD34-expressing cells to acquire flow cytometric features of apoptosis/necrosis on exposure to an ammonium chloride-based red blood

- cell lysing reagent / Serke S., van Lessen A., Pardo I., Huhn D. // *J Hematother.* – 1998. – Vol. 7. – №.4. – P. 315–318.
144. By Li Lu Enrichment, Characterization, and Responsiveness of Single Primitive CD34⁺⁺⁺ Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Progenitors With High Proliferative and Replating Potential / By Li Lu, Mang Xiao, Rong-Nian Shen, Grigsbi R., Broxmeyer H. // *Blood.* – 1993. – Vol. 81. – №.1. – P. 41–48.
145. Yi-Hsin Chan J. Adhesion receptors on hematopoietic progenitor cells / Yi-Hsin Chan J., Watt S. M. // *British Journal of Haematology.* – 2001. – Vol. 112. – №.3 – P. 541–557.
146. El-Marsafy S. Functional role of PECAM-1/CD31 molecule expressed on human cord blood progenitors / El-Marsafy S., Carosella E.D., Agrawal S.G., Gluckman E., Mansur I.G., Elhabazi A., Boumsell L., Bensussan A. // *Leukemia.* – 1996. – Vol. 10. – №.8 – P. 1340–1346.
147. Mei-Dan E. Proangiogenic immature myeloid cells populate the human placenta and their presence correlates with placental and birthweight / Mei-Dan E., Fainaru O., Hantisteanu S., Shavit T., Ellenbogen A., Hallak M. // *Gynecol.* – 2012. – Vol. 207. – №.2 – P. 141–145.
148. Egeland T. Myeloid differentiation of purified CD34⁺ cells after stimulation with recombinant human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (CSF), granulocyte-CSF, monocyte-CSF, and interleukin-3. *Blood* / Egeland T., Steen R., Quarsten H., Gaudernack G., Yang Y.C., Thorsby E. // *Blood.* – 1991. – Vol. 178. – №.12 – P. 3192–3199.
149. Bender J.G. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry / Bender J.G., Unverzagt K.L., Walker D.E., Lee W., Van Epps D.E.,

- Smith D.H., Stewart C.C., To L.B. // *Blood*. – 1991. – Vol. 77. – №.12 – P. 2591–3199.
150. Chena L. Identification of CD13⁺CD36⁺ cells as a common progenitor for erythroid and myeloid lineages in human bone marrow / Chena L., Gaoa Z., Zhua J., Rodgers G.P. // *Exp Hematol*. – 2007. – Vol. 35. – №.7 – P. 1047–1055.
151. Schmitt C. CD34-positive early stages of human T-cell differentiation / Schmitt C., Ktorza S., Sarun S., Verpilleux M.P., Blanc C., Deugnier M.A., Dalloul A., Debré P. // *Leuk Lymphoma*. – 1995. – Vol. 17. – №.1–2 – P. 43–50.
152. Rabinowich, H. Expression and function of CD7 molecule on human natural killer cells / Rabinowich, H., Pricop, L., Herberman, R. B., and Whiteside, T. L. // *J. Immunol*. – 1994. – Vol. 152. – №.2 – P. 517–526.
153. Warren H.S. Loss of activation-induced CD45RO with maintenance of CD45RA expression during prolonged culture of T cells and NK cells / Warren H.S., Skipsey L.J. // *Immunology*. – 1991. – Vol. 74. – №.1 – P. 78–85
154. Van Epps D.E. Harvesting, characterization, and culture of CD34⁺ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood / Van Epps D.E., Bender J., Lee W., Schilling M., Smith A., Smith S., Unverzagt K., Law P., Burgess J. // *Blood Cells*. – 1994. – Vol. 20. – №.2–3 – P. 411–23.
155. Ash R.C. Studies of human pluripotential hemopoietic stem cells (CFU-GEMM) *in vitro* / Ash R.C., Detrick D.A. Zanjani E.D. // *Blood*. – 1981. – Vol. 58. – №.2 – P. 309–316.
156. Sadahira Y. Role of the macrophage in erythropoiesis / Sadahira Y., Mori M. // *Pathol Int*. – 1999. – Vol. 49. – №.10 – P. 841–848.
157. Tepperman D. Erythropoietic Colonies in Cultures of Human Marrow / Tepperman D., Curtis J. E. McCulloch E. A. // *Blood*. – 1974. – Vol. 44. – №.5 – P. 659–669.

158. Duarte AS. Bacterial collagenases - A review. / Duarte AS, Correia A., Esteves AC. // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2014. – Vol. 22. – №.1 – P. 1–21.
159. Asgharnia M. Placental weight and its association with maternal and neonatal characteristics / Asgharnia M., Esmailpour N., Poorghorban M., Atrkar-Roshan Z. // *Acta Medica Iranica*. – 2008. – Vol. 46. – №.6 – P. 467–472.
160. Brooke G. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials / Brooke G., Rossetti T., Pelekanos R., Ilic N., Murray P., Hancock S., Antonenas V., Huang G., Gottlieb D., Bradstock K., Atkinson K. // *British Journal of Haematology*. – 2009. – Vol. 144. – №.4 – P. 571–579.
161. Solves P. Maternal, neonatal and collection factors influencing the haematopoietic content of cord blood units / Solves P., Perales A., Moraga R., Saucedo E., Soler M.A., Monleon J. // *Acta Haematol.* – 2005. – Vol. 113. – №.4 – P. 241–246.
162. M-Reboredo N. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation / M-Reboredo N., Diaz A., Castro A., Villaescusa R.G. // *Bone Marrow Transplant.* – 2000. – Vol. 26. – №.12 – P. 1263–1270.
163. Wu J.Y. Banking and transplantation of umbilical cord blood in Guangzhou, China / 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. // *Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8. – №.5 – P. 488–497.
164. Bensinger W.I. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers / 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. // *N Engl J Med*. – 2001. – Vol. 344. – №.3 – P. 175–181.