

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

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

Автореферат

дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертація є рукопис.

Робота виконана у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ)

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Лукаш Любов Леонідівна
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України
завідувач відділу генетики людини

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор,
Глузман Данило Фішелевич
Інститут експериментальної патології, онкології та
радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
завідувач відділу імуноцитохімії та онкогематології

доктор біологічних наук, професор
Петренко Олександр Юрійович
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України
завідувач відділу кріобіохімії

Захист дисертації відбудеться «26» січня 2016 р. о 10:30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (03680, м.Київ-680, вул. Академіка Заболотного, 150).

Автореферат розісланий «24» грудня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук,
с.н.с.



Крупська І.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Значною проблемою гематології досі залишається дефіцит донорів гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин (ГСПК) для трансплантації при онкогематологічних захворюваннях і вроджених порушеннях кровотворення. Хоча трансплантація HLA-ідентичних ГСПК кісткового мозку широко використовується для відновлення гемопоєзу, 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 (Verfaillie et al., 2002). 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 певні ускладнення для донорів (Cheuk et al., 2013). Починаючи із 1988 року, у клінічній практиці почали використовувати пуповинну кров як джерело ГСПК, і на сьогодні вона все ширше застосовується у світі для лікування вроджених та злоякісних захворювань кровотворення (Broxmeyer et al., 2013). Перевагами пуповинної крові як джерела ГСПК є легкість і безпечність її отримання для донора; доступність для негайного використання зразків кріоконсервованих клітин, типованих за HLA; можливість використання зразків сумісних лише за 3 чи 4 генами, що кодують HLA; порівняно низька вірогідність розвитку гострої або хронічної реакції «трансплантат проти хазяїна». Однак існують і недоліки, які включають недостатню для дорослих кількість зібраних клітин, більш тривалий час відновлення нормального рівня нейтрофілів, тромбоцитів і лімфоцитів у реципієнтів після трансплантації та меншу вірогідність приживлення трансплантата (Cheuk et al., 2013; Broxmeyer et al., 2013). Багатим джерелом ГСПК є також фетальна печінка людини (Грищенко та ін, 1988; Golfier et al., 1999). Трансплантації клітин фетальної печінки *in utero* та постнатально дають багатообіцяючі результати при лікуванні імунодефіцитних захворювань, вроджених порушень метаболізму та апластичної анемії (Touraine, 1996; Touraine et al., 1993). Однак фетальна печінка містить відносно незначний об'єм клітин, отримання яких представляє собою достатньо складку процедуру. Крім того, застосування ГСПК фетальної печінки є проблемним із етичних міркувань (Golfier et al., 1999).

Таким чином, пошук нових додаткових джерел ГСПК є важливим для медицини. В цьому сенсі привертає увагу плацента людини. Дослідження останніх років показали, що плацента людини відіграє важливу роль у фетальному гемопоєзі (Bárcena et al., 2009; Serikov et al., 2009), і вважається, що вона може бути потенційним додатковим джерелом ГСПК для трансплантацій (Bárcena et al., 2011). Однак імунофенотип плацентарних ГСПК і їхня мультипотентність все ще недостатньо вивчені. Тож для оцінки можливостей

застосування ГСПК зрілої плаценти для клінічних цілей необхідно дослідити їхні характеристики. При цьому важливо порівняти імунотип та потенціал до диференціювання ГСПК плаценти із відповідними клітинами інших кровотворних тканин плода та циркулюючими ГСПК пуповинної крові, які 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 імунотипових характеристик та потенціалу до диференціації *in vitro* ГСПК 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 і 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 провести порівняльне дослідження імунотипу кровотворних клітин плаценти, пуповинної крові й фетальної печінки людини та їхнього потенціалу до диференціювання *in vitro*, а також розробити методи виділення ГСПК із нативної та кріоконсервованої плаценти. 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 міело-, 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 арсенал сучасних методів, що застосовуються в клітинних технологіях: 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 цитофлуориметрія, імуноцитохімічне дослідження, FISH аналіз та статистична обробка даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше нами одержано дані порівняльного аналізу ГСПК плаценти з відповідними клітинами інших гемопоетичних тканин, таких як пуповинна кров та фетальна печінка, які вказують на те, що в зрілій плаценті проходить активний гемопоез, що дозволяє рекомендувати цей клітинний матеріал для використання в медицині.

В ході виконання роботи розроблено певні біотехнологічні підходи. Модифіковано методи виділення ГСПК плацентарної тканини, що відрізняються від відомих запропонованих способів отримання цих клітин такими параметрами: зменшено кількість ферментів та застосовано їх нижчі концентрації. Розроблено спосіб виділення ГСПК із кріоконсервованої тканини плаценти шляхом швидкої ферментативної обробки.

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

Результати порівняльного імунофенотипування ГСПК різних джерел продемонстрували, що для 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 субпопуляцій 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 ($CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$).

Отримано нові дані порівняльного аналізу експресії CD90 на ГСПК із плацентарної тканини та пуповинної крові, які показують, що для ГСПК плаценти характерний достовірно вищий рівень експресії цього маркеру. 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. В той же час експресія CD133 маркеру на ГСПК в обох тканинах суттєво не відрізняється.

Плацентарна тканина, як і інші джерела ГСПК (пуповинна кров, фетальна печінка) містить мієлоїдні, еритроїдні, мієло-еритроїдні, T/NK- та B- лімфоїдні прогенітори, що може свідчити про проходження в плаценті процесів мієло-еритро- та лімфопоезу. Вагомими та раніше не встановленими даними є певні 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, поряд із ранніми виявляються також пізні мієлоїдні прогенітори.

Показано, що в умовах культивування *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 із фракцій мононуклеарних клітин плацентарної тканини, клітин пуповинної та мобілізованої периферичної крові до утворення плоских еритроїдних колоній (ПЕК), які містять ранні еритроїдні прогенітори, при культивуванні в напівтвердих середовищах. Оскільки ПЕК раніше не були описані, в даній роботі вони детально охарактеризовані.

Практичне значення отриманих результатів. Результати наших досліджень створюють біотехнологічні підходи і дають теоретичне обґрунтування перспективності ГСПК плацентарної тканини для проведення трансплантацій з лікувальними цілями. Отримані дані дозволяють припустити, що використання при трансплантації ГСПК пуповинної крові разом із відповідними клітинами зрілої плаценти можуть усунути деякі недоліки пуповинної крові, як джерела ГСПК. Оскільки, як нами встановлено, плацентарні ГСПК мають більш високий вміст мієлоїдно-комітованих клітин порівняно з пуповинною кров'ю, ко-трансплантація ГСПК пуповинної крові та плаценти, ймовірно, 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. Запропонований нами спосіб кріоконсервування тканини плаценти як джерела ГСПК дозволяє зберегти такі клітини з метою їх подальшого використання. Слід відзначити, що даний спосіб кріоконсервування тканини був розроблений нами раніше для збереження мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (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 (Шаблій та ін., 2012, Шаблій та ін., 2013). В даній роботі розроблено спосіб отримання ГСПК із кріоконсервованої тканини плаценти, що є передумовою для розробки технології збереження та виділення цих клітин 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 ця тканина може бути застосована у випадку захворювань. На нашу думку, розробка методів отримання різних типів 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 цитофлуориметрії 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень.

Плаценту (n=17) та пуповинну кров (n=149) отримували після пологів (фізіологічних або шляхом кесаревого розтину) на 39–41 тижні вагітності у 23–36-річних жінок за їхньою інформованою згодою. Зразки крові донорів тестували на наявність антитіл та антигенів інфекційних агентів, а тканину плаценти - на наявність аеробних, анаеробних бактерій, а також грибової інфекції. Для дослідження плацентарну тканину подрібнювали на фрагменти 1-3×1-3×1-3 мм, які промивали розчином Хенкса до повного знебарвлення розчину. Потім тканину ферментували двома методами: за методом №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. Тканину, що залишилась, інкубували зі свіжою порцією ферментів протягом 20 – 40 хв при +37° С. Фракцію клітин, що була отримана на обох стадіях об'єднували. За методом №2 відміту тканину ферментували за допомогою 0,1% колагенази та 0,6 од/мл діспази I (Gibco, Germany) у ростовому середовищі DMEM (Sigma, USA) з додаванням 5 мМ HEPES (Biomedicals, France) протягом 20 – 30 хв при +37° С. Фракцію мононуклеарних клітин отримували шляхом фракціонування на фіколі (щільність 1,077 г/мл, Biochrome, Німеччина). Фракцію мононуклеарних клітин з пуповинної крові (n=15) обробляли такою ж сумішшю ферментів, як і тканину плаценти, за

методом №1 протягом 50 хв при +37 °С і відмивали від залишків ферментів в PBS з додаванням 1 мг/мл BSA.

Фракцію ядровмісних клітин пуповинної крові (n=134) отримували із використанням 6 % гідроксиетилкрохмалю. Седиментування проводили до чіткого розділення фракції еритроцитів та ядровмісних клітин з подальшим фракціонуванням та центрифугуванням.

Джерелом фетальної печінки (n=7) та фетальної плаценти (n=1) 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. Для дослідження клітин фетальної плаценти тканину подрібнювали на фрагменти 1-3 мм та обробляли розчином ферментів: 0,2 % колагенази I, 0,35 мг/мл гіалуронідази, 100 од/мл DNaseI з додаванням 1 мг/мл BSA протягом 15 – 30 хв при +37 °С. Тканину, що залишилась, інкубували зі свіжою порцією ферментів протягом 30 – 40 хв при +37 °С. Відмивання клітин, їх об'єднання та виділення фракції моноклеарних клітин проводили так само, як для клітин зрілої плаценти.

Гемопоетичні стовбурові клітини «мобілізованої» периферичної крові отримували з проби периферичної крові (n=1) пацієнта з гострим нелімфобластним лейкозом в стадії ремісії за його інформованої згоди; йому була проведена попередня процедура мобілізації ГСК із відповідними мобілізуючими агентами та збором CD34⁺ клітин за стандартною методикою.

Для кріоконсервування до відмитих фрагментів тканини плаценти додавали спочатку розчин Хенкса у співвідношенні близько 3 мл на 1 г тканини, а потім 1:1 1,5 М розчин ДМСО (Sigma, США) до кінцевої концентрації 0,7 М. Для кріоконсервування ядровмісних клітин пуповинної крові до суспензії повільно додавали розчин 1,5 М ДМСО до кінцевої концентрації 0,7 М. Кріоконсервування здійснювали в кріоампулах за допомогою приладу програмного заморожувача (IceCube, Australia) по триетапній програмі за методикою Г.С. Лобинцевої та В.А. Шаблія та переносили кріоампули у рідкий азот (-196 °С) на довгострокове зберігання. Розморожування здійснювали на водяній бані (+38...+40 °С) до появи в кріоампулі рідкої фази (0 °С).

Для визначення потенціалу до диференціювання клітини плаценти та пуповинної крові культивували в кількості $5 \cdot 10^4$ на чашку Петрі (Ø35 мм) у середовищі MethoCult (StemCell Technologies, Канада) або агаровмісному середовищі із факторами росту при +37 °С в атмосфері з 5% CO₂. Підрахунок колоній здійснювали на 14 добу росту за допомогою інвертованого мікроскопу СКХ41 (Olympus, Японія).

Для проведення імуноцитохімічного аналізу клітин ПЕК на 14-ту добу культивування ізолювали колонії, ресуспендували та наносили у вигляді мазка

на предметне скло. Для детекції глікофору А використовували моноклональні антитіла anti-CD235aPE (BectonDickinson, США) і для посилення сигналу візуалізації – вторинні антитіла goatantimouse-Alexa 488 (Invitrogen, Німеччина). Візуалізацію зображень проводили на конфокальному лазерному скануючому мікроскопі FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

Для проведення імунофенотипування клітин використовували такі флуорохром-мічені моноклональні антитіла (BectonDickinson, США): anti-CD34 APC, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD14 PacificBlue, anti-45RA FITC, anti-CD7 PE, anti-CD19 PE-Cy7, anti-CD33 FITC, anti-CD235a PE. Аналізували лише популяцію живих клітин, які не забарвлювались барвником 7-AAD. Імунофенотипування проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (BectonDickinson, США) за допомогою програми FACSDiva 6.1.2, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 6 параметрів флуоресценції. 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 ж 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 – «⁺⁺⁺».

FISH аналіз проводили на клітинах колоній, що виростили на 14-ту добу. Для аналізу брали плаценту від новонароджених чоловічої статі (n=2). Аналіз проводили із використанням проб CEPX SpectrumOrange та CEPYSpectrumGreen (Abbot Molecular, USA) згідно інструкції виробника. Для візуалізації ядер використовували DAPI (Abbot Molecular, USA). Для аналізу підраховували 300 ядер. Візуалізацію проводили на флуоресцентному прямому мікроскопі Zeiss Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, USA).

У тексті результати представлені у вигляді середніх величин з 95 % довірчим інтервалом. В роботі наведені 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. Обробку експериментальних даних проводили з використанням програмного забезпечення «MicrosoftOfficeExcel» та STATISTICA 8.0 program (StatSoftInc. 2007, USA).

Результати досліджень та їх обговорення.

Порівняльна імунофенотипова характеристика ГСПК плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки. Нами модифіковано методи виділення ГСПК із тканини плаценти. Модифікація полягала в зменшенні концентрації гіалуронідази у суміші ферментів (коллагеназа, ДНКаза, гіалуронідаза). Запропонована модифікація методу виділення клітин (метод №1) є економічно вигіднішою та, на нашу думку, із меншим негативним впливом на клітини. З метою пошуку методів, які надалі можуть мати практичне значення, що передбачає використання лише декількох ферментів у низьких концентраціях при нетривалому часі інкубації, нами застосовано метод виділення ГСПК із частковою заміною колагенази на диспазу без використання ДНКаз та гіалуронідази (Метод №2).

Нами показано, що суміш ферментів для отримання суспензії плацентарних клітин неоднозначно впливає на результати проточної цитофлуориметрії. У зразках пуповинної крові після ферментативної обробки спостерігалось зростання вмісту клітин з фенотипами $CD7^+CD45RA^+$ та $CD45^+CD45RA^+$. Тому, для проведення порівняльного дослідження клітин, виділених за допомогою суміші ферментів із різних тканин, необхідно було уніфікувати протокол їх отримання та підготовки для аналізу.

В нашій роботі для кількісної оцінки ГСПК із тканини плаценти вперше використано ISHAGE протокол. Такий протокол прийнято використовувати для аналізу ГСПК кісткового мозку та пуповинної крові. Нами вперше показано, що стратегія гейтування ISHAGE може бути застосована для аналізу ГСПК плацентарної тканини.

Згідно обраної стратегії гейтування $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$ клітини було визначено серед усіх життєздатних $CD45^+$ клітин як ГСПК (рис. 1). Аналіз показав, що вміст ГСПК серед життєздатних $CD45^+$ клітин нативної плацентарної тканини достовірно не відрізнявся за методами виділення №1 та №2 і склав 0,56 % (0,39 – 0,76 %, n = 16) та 1,14 % (0,29 – 2,55 %, n = 5) відповідно. Вміст ГСПК серед популяції $CD45^{low}CD34^+$ клітин для плацентарної тканини (79,7 % (73,4 – 85,3 %, n = 16)) та фетальної печінки (78,9 % (58,6 – 93,6 %, n = 6)) був схожий, але достовірно нижчий для пуповинної крові (94,7 % (90,9 – 97,6 %, n = 15)). Вважається, що лімфоцитоподібні $CD34^+CD45^{low}$ клітини є «справжніми» ГСПК, тому для кількісного аналізу останніх в таких гемопоетичних тканинах, як плацента та фетальна печінка, важливим є етап гейтування за морфологією.

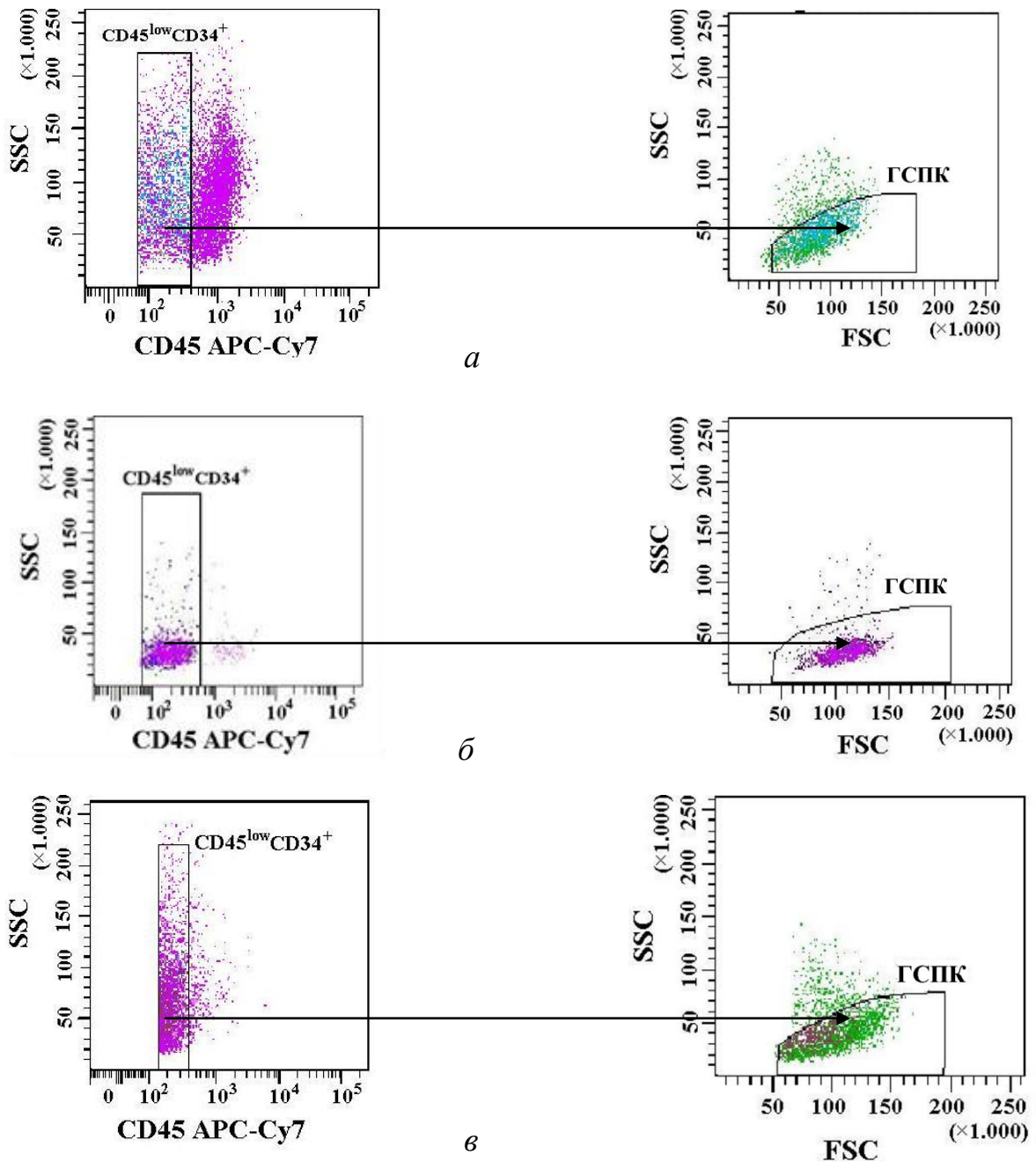


Рис. 1. Гістограми гейтування ГСПК ($CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$) за параметрами прямого (FSC) та бічного (SSC) світлорозсіювання із популяції $CD45^{low}CD34^+$ клітин нативної плаценти (*a*), нативної пуповинної крові (*б*) та кріоконсервованої фетальної печінки (*в*)

Порівняльний аналіз фенотипу клітин різних джерел в нашій роботі показав, що доцільним є гейтування з виділенням трьох субпопуляцій клітин за експресією CD34 в зрілій та фетальній плаценті, які можна ідентифікувати як $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$ та $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ (рис. 2, *a*, *б*). Фетальна печінка також містить такі субпопуляції, однак із порівняно нижчою інтенсивністю експресії CD34 (рис. 2, *в*). В пуповинній крові нами виявлено лише $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ та $CD34^{++}CD45^{low/-}$ клітини (рис. 2, *г*). 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 морфологічною гетерогенністю. На відміну від пуповинної крові та фетальної печінки в зрілій та фетальній плацентарній тканині були виявлені субпопуляції $CD34^{+/low}CD45^{hi}$ та $CD34^{++}CD45^{hi}$ клітин (рис. 2, *a - г*). Вони характеризувались вищим рівнем експресії лінійних маркерів у порівнянні з трьома субпопуляціями $CD45^{low}$ та $CD34$ -позитивних клітин.

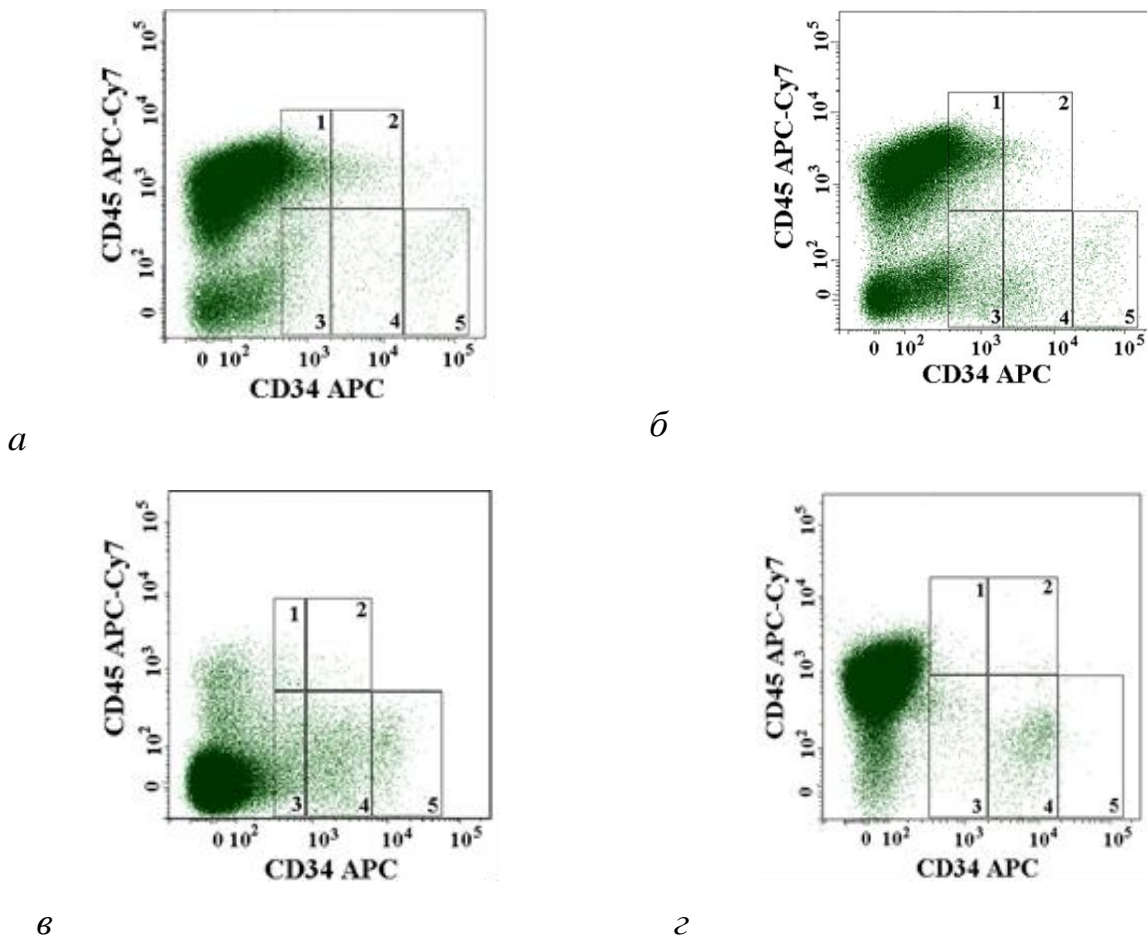


Рис. 2. Гістограми субпопуляцій клітин з фенотипом $CD34^{+/low}CD45^{hi}$ (1), $CD34^{++}CD45^{hi}$ (2), $CD34^{+/low}CD45^{low/-}$ (3), $CD34^{++}CD45^{low/-}$ (4) та $CD34^{+++}CD45^{low/-}$ (5) із тканини зрілої плаценти (*a*), тканини фетальної плаценти (*б*), фетальної печінки (*в*) та пуповинної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

Слід відзначити, що за нашими даними плацентарні гемопоетичні попередники більш гетерогенні за фенотипом, ніж такі клітини в пуповинній крові та фетальній печінці. Плацентарні ГСПК експресували CD133 так само, як і ГСПК пуповинної крові (рис. 3, *a*). Експресія CD133 спостерігалась лише в популяції $CD34^{++}CD45^{low/-}$ клітин плаценти та пуповинної крові (рис. 3., *б, в*), що свідчить про найбільшу незрілість такої субпопуляції на відміну від інших,

до того ж в ній відсутня експресія CD33, CD235, CD19, CD7 і CD45RA. Той факт, що в зрілій та фетальній плаценті виявляються прогеніторні клітини різних стадій диференціювання свідчить про проходження гемопоезу.

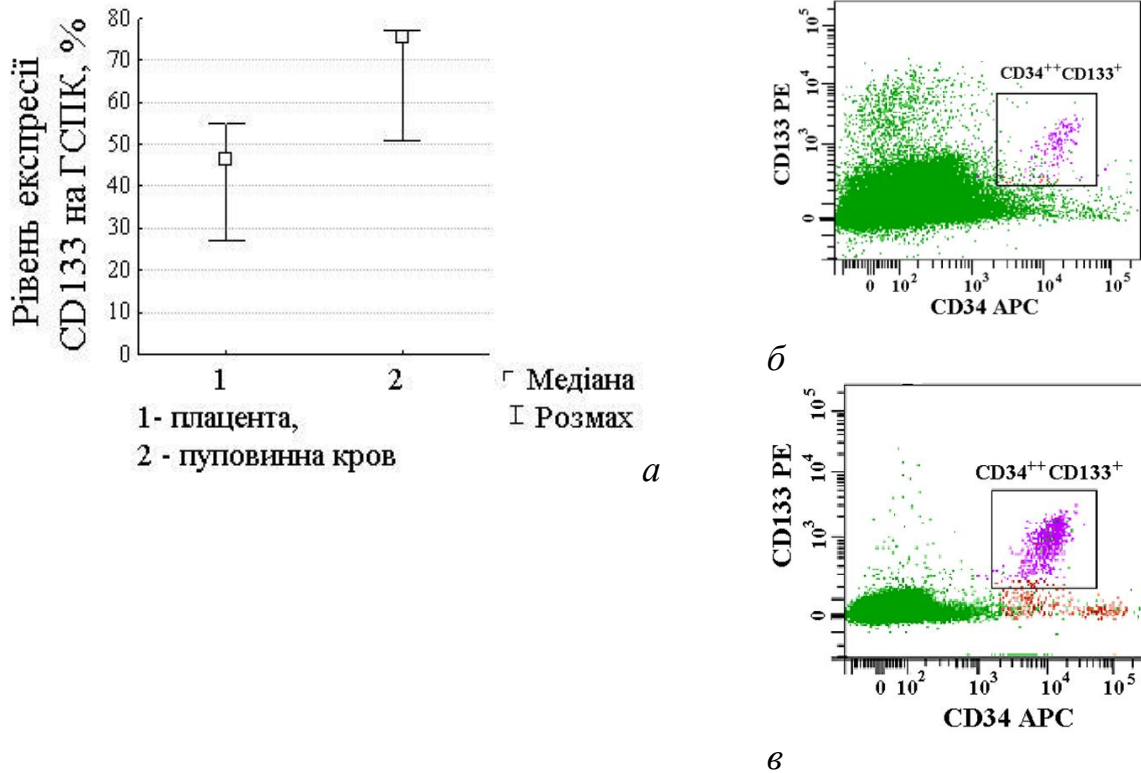


Рис. 3. Характер експресії CD133 на CD34-позитивних клітинах плаценти та пуповинної крові. *a* – різниця в характері експресії CD133 на ГСПК зрілої плацентарної тканини ($n = 4$) та кордової крові ($n = 4$), $p < 0.05$. Гістограми експресії CD34 та CD133 на клітинах плацентарної тканини (*б*) та пуповинної крові (*в*)

В наших дослідженнях вперше показано, що ГСПК плацентарної тканини мають достовірно вищий рівень експресії CD90 у порівнянні з ГСПК пуповинної крові (рис. 4.), що може свідчити про більшу кількість ранніх комітованих прогеніторів в плаценті.

Вперше встановлено, що плацентарні ГСПК містять дві субпопуляції: $CD34^+CD45^{low}CD31^{hi}$ та $CD34^+CD45^{low}CD31^{low}$, тоді як 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 знаходяться в екстравакулярних компартментах.

Зріла плацентарна тканина містила популяцію ранніх ($CD34^+CD45^{low}CD33^+SSC^{low}$) та більш зрілих ($CD34^+CD45^{low}CD14^+SSC^{low}$) міелоїдних, еритроїдних ($CD34^+CD45^{low}CD235^+SSC^{low}$), Т- ($CD34^+CD45^{low}CD17^+SSC^{low}$) та В- ($CD34^+CD45^{low}CD19^+SSC^{low}$) лімфоїдних попередників. Результати порівняльного аналізу вмісту таких попередників серед гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) зрілої плаценти, пуповинної

крові та фетальної печінки наведено на рис. 5. Особливістю плацентарної тканини, на відміну від пуповинної крові, є наявність субпопуляції ГПК, 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 ГПК, хоча загалом при даній вибірці достовірної різниці не виявлено.

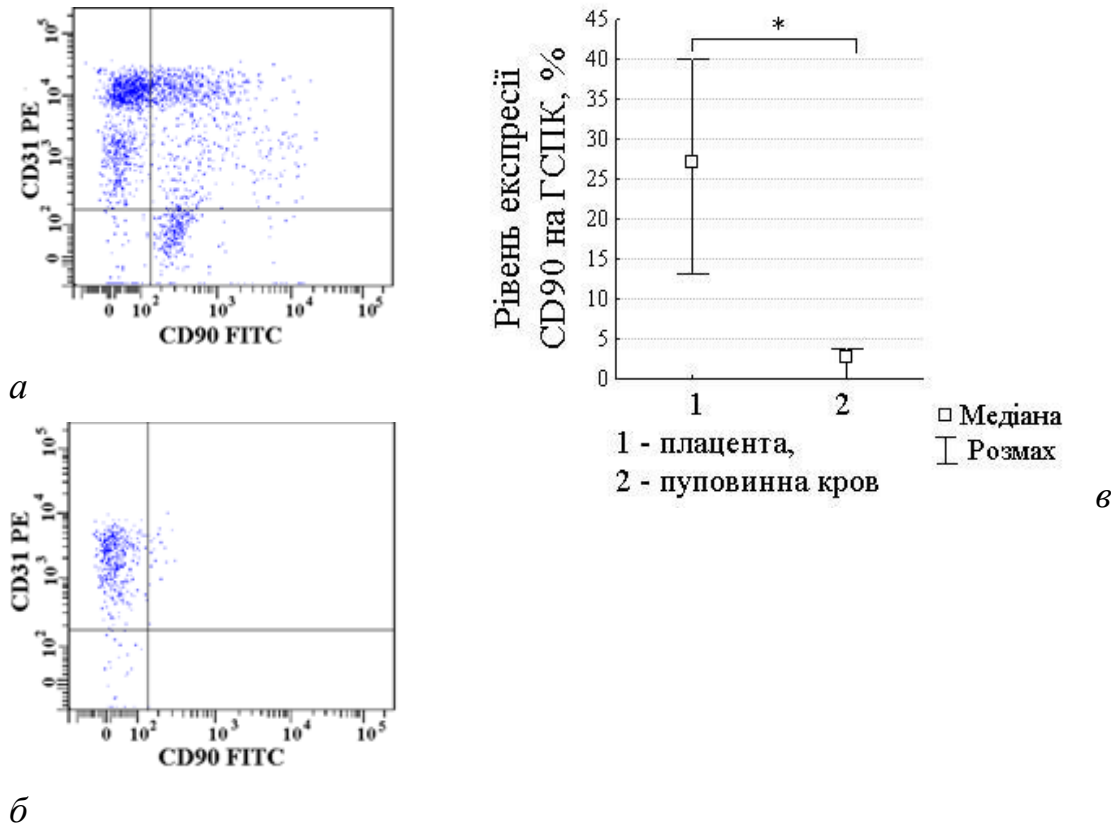


Рис. 4. Гістограми експресії CD90 та CD31 на ГСПК зрілої плацентарної тканини (а) та пуповинної крові (б); в – рівень експресії CD90 на ГСПК плацентарної тканини (n=4) та пуповинної крові (n=5), * – достовірна різниця, $p < 0.05$

Вперше встановлено, що вміст лінійно-комітованих прогеніторів серед ГПК в плацентарній тканині достовірно вищий, ніж у пуповинній крові та нижчий по відношенню до фетальної печінки. При цьому сумарний вміст лімфоїдних прогеніторів серед ГПК достовірно більший в фетальній печінці, ніж у пуповинній крові та плацентарній тканині. Загальний вміст проаналізованих мієлоїдних та еритроїдних прогеніторів серед ГПК вищий в плацентарній тканині порівняно з пуповинною кров'ю, однак нижчий, ніж в фетальній печінці. Нами показано, що експресія маркерів лінійного диференціювання CD14, CD33, CD7 та CD19 зростає із зниженням рівня експресії CD34 на CD45^{low/-} клітинах зрілої плаценти а також пуповинної крові. Наші дані свідчать про проходження мієлопоезу, еритропоезу, та, можливо, і лімфопоезу у зрілій плацентарній тканині.

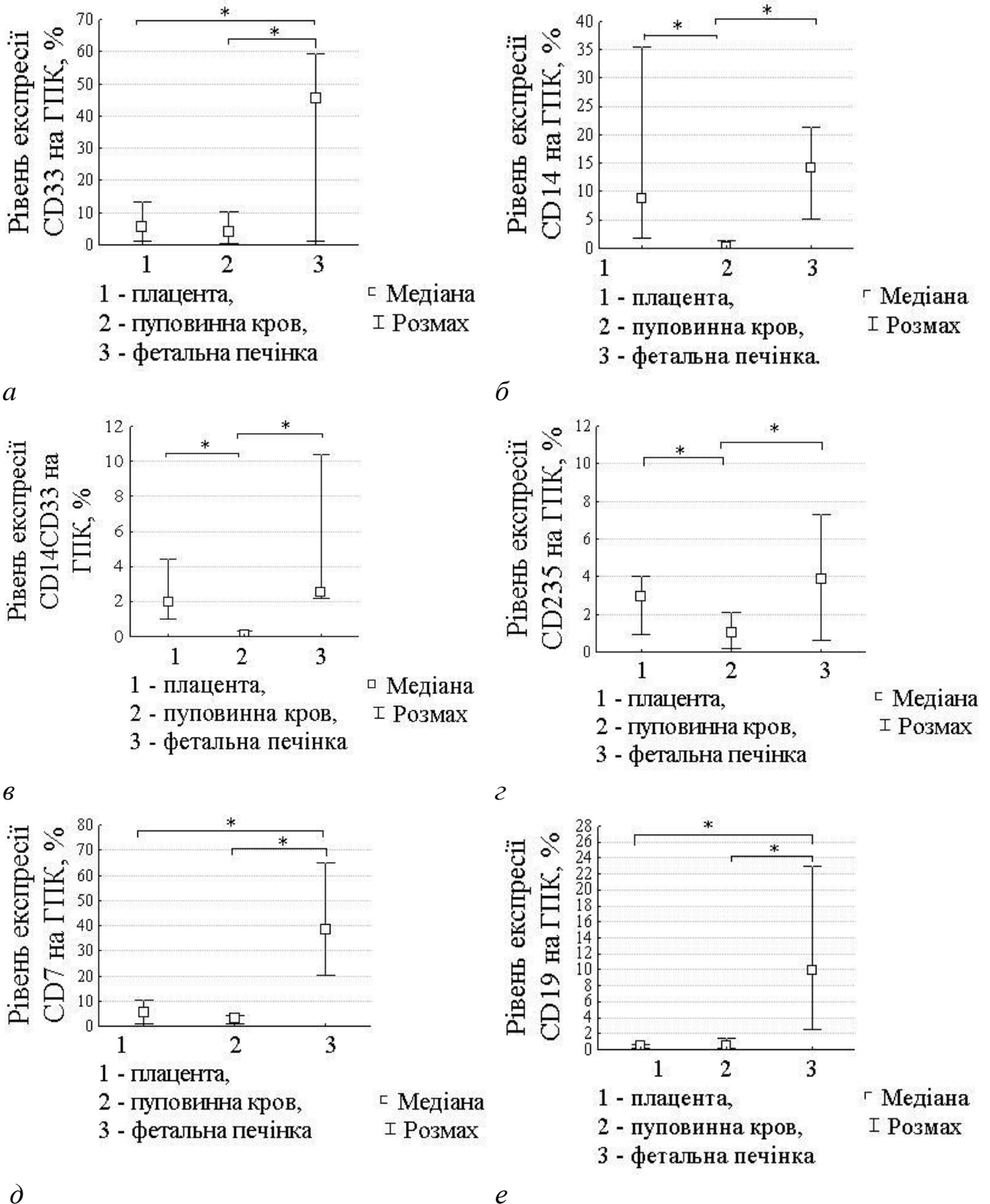


Рис. 5. Рівень експресії CD33 (а), CD14 (б), CD33CD14 (в), CD235 (г), CD7 (д) та CD19 (е) на ГПК плацентарної тканини, пуповинної крові та фетальної печінки, * - $p < 0.05$ (плацента) $n = 6$, (пуповинна кров) $n = 6$, (фетальна печінка) $n = 3 - 7$

Порівняння даних по відносному вмісту міелоїдних, еритроїдних та лімфоїдних комітованих клітин серед усіх комітованих ГПК в зрілій

плацентарній тканині та пуповинній крові не показало достовірної різниці (рис.6.).

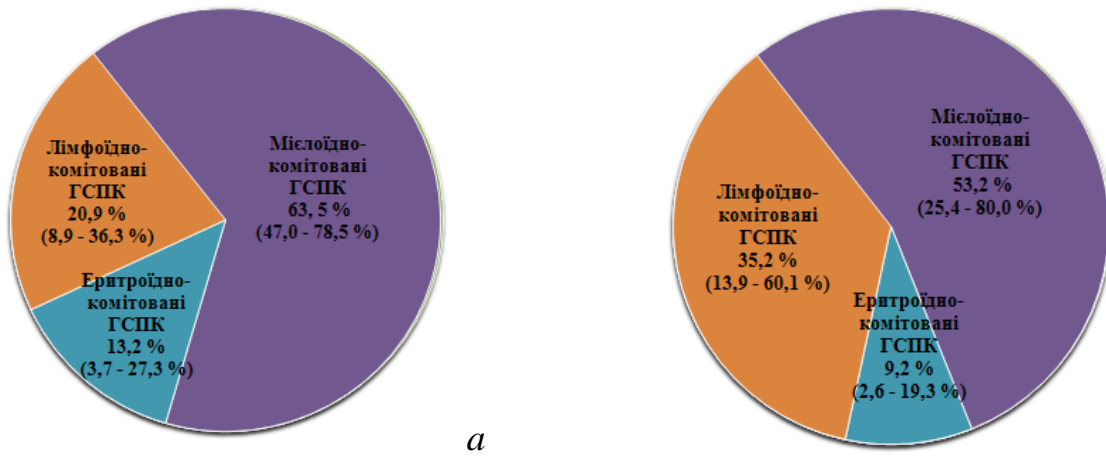


Рис. 6. Відносний вміст мієлоїдних, еритроїдних та лімфоїдних комітованих клітин серед усіх комітованих ГПК в зрілій плацентарній тканині (а) та пуповинній крові (б), $p < 0.05$, $n = 6$

Диференціація ГСПК зрілої плаценти *in vitro* у порівнянні з пуповинною кров'ю. Нами показано, що клітини моноклеарної фракції із зрілої плаценти при культивуванні *in vitro* на 14 добу росту утворюють 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 (рис. 7. а, б). В нашій роботі за допомогою FISH аналізу підтверджено, що мультилінійні ГСПК плаценти мають фетальне походження (рис. 7. в).

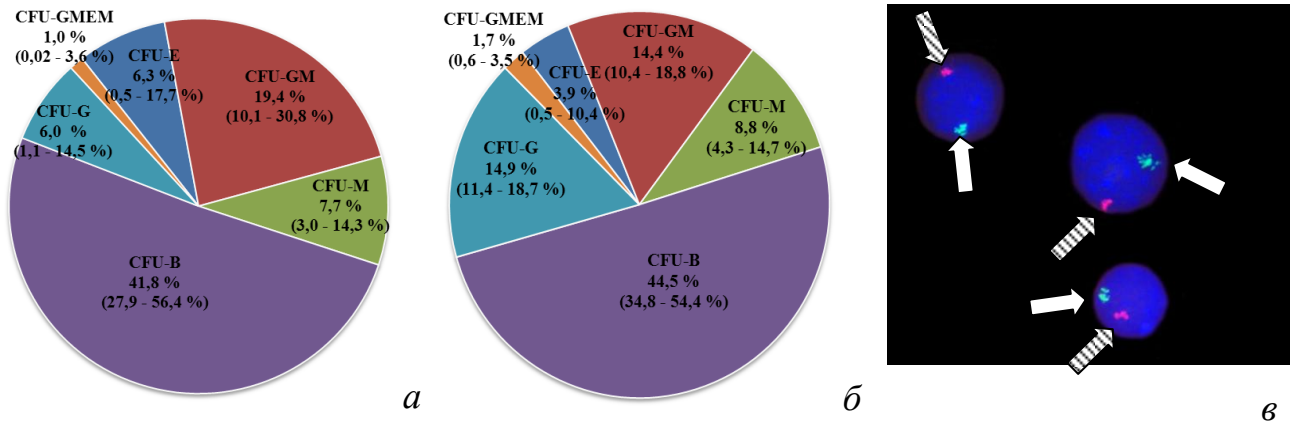


Рис. 7. Колоніє-утворювальний потенціал клітин плацентарної тканини (а) та пуповинної крові (б) *in vitro*, $n(\text{плацента})=6$, $n(\text{пуповинна кров})=10$, $p \leq 0,05$. Результати FISH аналізу клітин колоній, що уворювались після 14 дб культивування у метилцелюлозо-вмісному середовищі фракції моноклеарних клітин зрілої плаценти: X хромосома – зелений сигнал (вказано білою стрілкою), Y хромосома – червоний сигнал (вказано заштрихованою стрілкою), ок. $10\times$, об. $100\times$ (в)

Спосіб виділення ГСПК із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти та їхня характеристика. В нашій роботі розроблено спосіб виділення ГСПК із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти, який ґрунтується на швидкій ферментації тканини після кріоконсервування із застосуванням лише одного ферменту – 0,1 % колагенази. Було встановлено, що гемопоетичні прогенітори кріоконсервованої плаценти також містять субпопуляції із різним рівнем експресії CD34 (рис. 8, *а*). 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 нативної тканини. Вміст ГСПК серед популяції CD34⁺CD45^{low} клітин був 79,4 % (66,2 – 90,0 %, n=3), що подібно до показників для нативної тканини. ГСПК із кріоконсервованої тканини також містили субпопуляції CD34⁺CD45^{low}CD31^{hi} та CD34⁺CD45^{low}CD31^{low} клітин та експресували CD90. Метод кріоконсервування фрагментів тканини зрілої плаценти дозволяє зберігати функціонально активні ГСПК; про це свідчить утворення колоній різних типів при культивуванні клітин, виділених із розмороженої тканини (рис. 8, *б*, *в*).

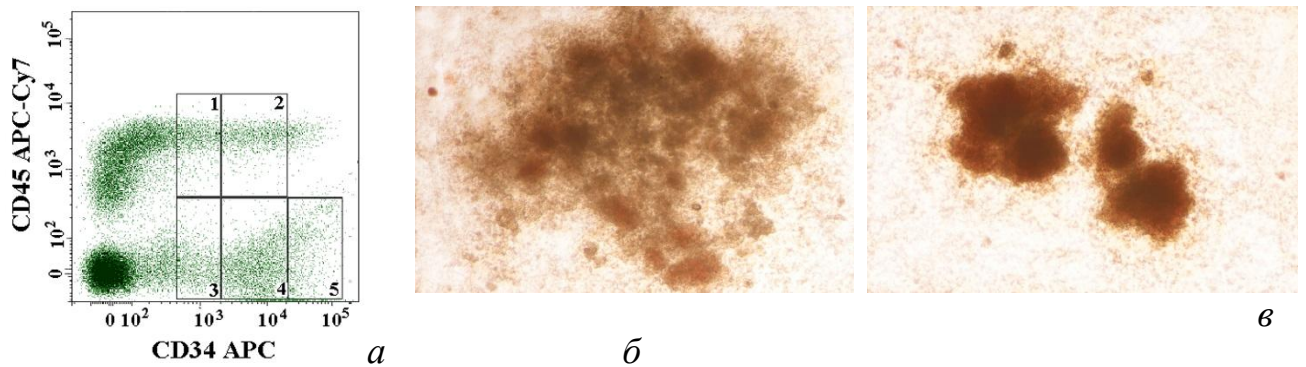


Рис. 8. Двовимірна гістограма (*а*), що показує наявність субпопуляцій CD34^{+/low}CD45^{low/-}, CD34⁺⁺CD45^{low/-}, CD34⁺⁺⁺CD45^{low/-}, CD34^{+/low}CD45⁺ та CD34⁺⁺CD45⁺ клітин серед гемопоетичних прогеніторів, отриманих із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти. Колонії клітин, отриманих ферментативним методом із кріоконсервованої зрілої плацентарної тканини: *б* – CFU-GEMM; *в* – BFU-E ; ок. $\times 10$, об. $\times 5$

Можливість отримання із кріоконсервованої тканини зрілої плаценти за розробленим нами раніше методом як ММСК, що було показано раніше, так і ГСПК дозволяє розширити можливості застосування кріоконсервованої плаценти в клінічній практиці.

Виявлення та характеристика плоских еритроїдних колоній (ПЕК) у напівтвердих культуральних середовищах. Вперше показано, що при культивуванні фракції мононуклеарних клітин плаценти утворюються ПЕК (рис. 9, *а*). Така характеристика не є особливістю плацентарних ГСПК, оскільки ПЕК виявляються також при культивуванні ядровмісних клітин пуповинної (рис. 9, *б*) та «мобілізованої» периферичної крові (рис. 9, *в*) в напівтвердому середовищі. В нашій роботі вперше описано такий тип колоній. Вже на початку

культивування кластери ПЕК добре помітні та відрізняються від усіх інших клонів, оскільки ростуть в одній площині. На 14 добу культивування вони, як правило, правильної округлої форми та мають чітко окреслені краї (рис. 9, б). На 14 добу в структурі колонії можуть утворюватись один (рис. 9, а) або декілька агрегатів, які мають червоне забарвлення. В деяких випадках такі колонії перетворювались в величезні поля клітин (рис. 9, з), що дозволяє вважати клітини, які їх утворюють, ранніми прогеніторами. Природу ПЕК було встановлено за допомогою проточної цитометрії (рис. 9, д) та імуноцитохімічного аналізу (рис. 9, е). 92% клітин ПЕК експресують CD235, що свідчить про їхню приналежність до еритроїдних колоній.

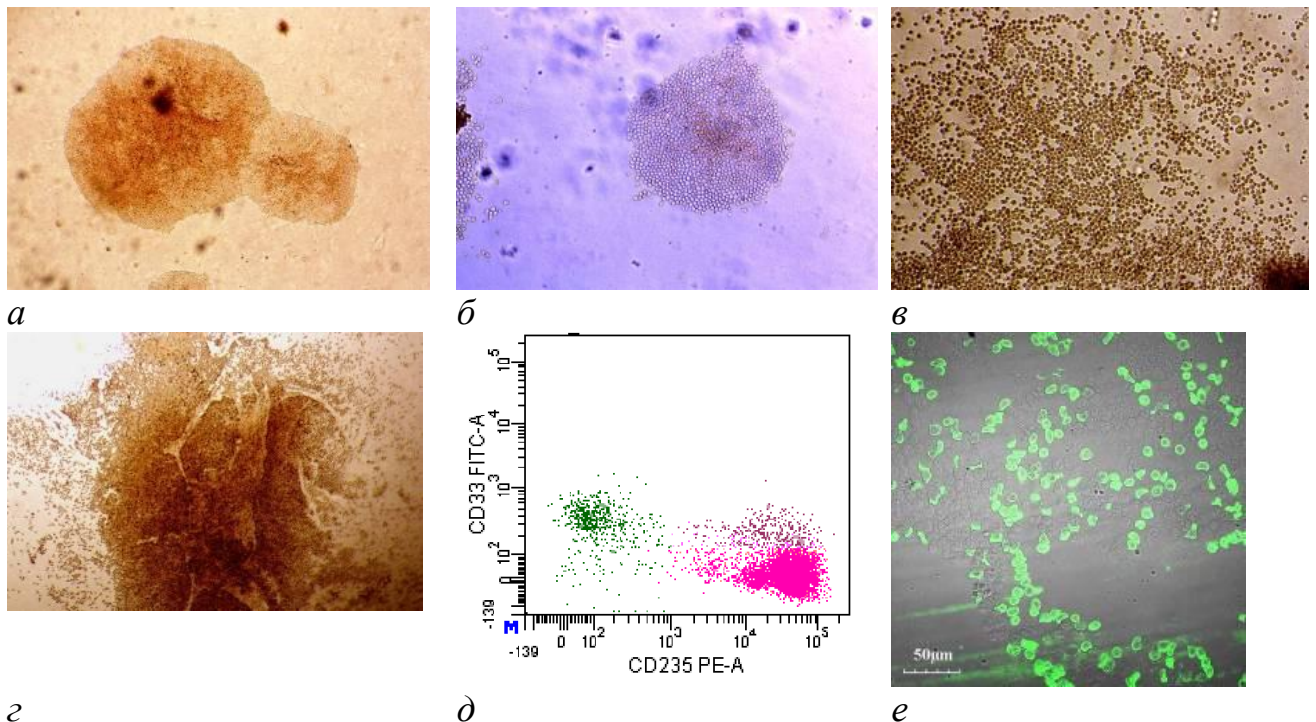


Рис. 9. ПЕК з агрегатом клітин плацентарної тканини (а), 14 доба культивування, ок. 10×, об. 5×; ПЕК нативної пуповинної крові (б), 14 доба культивування, ок. 10×, об. 10×; ПЕК клітин «мобілізованої» периферичної крові (в), 14 доба культивування, ок. 10×, об. 5×; велика колонія у вигляді поля (з), 14 доба культивування, ок. 10×, об. 5×; а, б, в, з, – світлова мікроскопія. Двовимірні гистограми експресії поверхневих маркерів CD235 та CD33 (д). Виявлення експресії CD235 на поверхневій мембрані клітин ПЕК без агрегатів в культурі ядровмісних клітин пуповинної крові в агаровмісному середовищі, комбінація флуоресцентної мікроскопії та фазового контрасту (е)

При підрахунку та класифікації колоній після культивування в напівтвердих середовищах, вірогідність появи ПЕК в метилцелюлозо-вмісному середовищі достовірно нижче ($p=0,0006$), ніж в агаро-вмісному середовищі і складає $2,5 \% \pm 1 \%$ ($n=238$) та $58 \% \pm 4,8 \%$ ($n=108$), відповідно. 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.

Узагальнення. Сукупність результатів наших експериментальних досліджень стосовно імунофенотипу ГСПК та їхнього колоніє-утворювального потенціалу та доступних літературних даних свідчить на користь уявлення про плаценту як активний гемопоетичний орган протягом всього терміну вагітності. На основі отриманих нами даних 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 (AsgharniaM, et al., 2008), кількість моноклеарних клітин на 100 г тканини становить 1×10^8 , а кількість CD45⁺ клітин – 74 % серед усіх моноклеарних клітин, ізольованих із плацентарної тканини (Brooke G, et al., 2008). Тож, одна плацента містить таку ж кількість ГСПК, як і зразки пуповинної крові. 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 їх малим вмістом та незрілістю прогеніторів. 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. Отримані результати порівняльного аналізу плацентарних ГСПК із такими клітинами пуповинної крові та фетальної печінки і ефективність розробленого нами способу виділення ГСПК із кріоконсервованої плаценти є підставою для створення низькотемпературних банків плацентарної тканини, що забезпечать доступність клітинних матеріалів для використання у будь який час.

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 ГСПК 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 раних еритроїдних прогеніторів і виявляються при культивуванні ядровмісних клітин пуповинної крові, плаценти та «мобілізованої» периферичної крові в напівтвердих середовищах.

ПРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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. *Особисто здобувачем проведено всі виділення клітин із зрілої і фетальної плаценти та пуповинної крові; проведено порівняння морфології та експресії поверхневих маркерів для ГСПК плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки; здійснено кількісний аналіз мієлоїдних, еритроїдних та лімфоїдних попередників у різних джерелах; проведено культивування клітин із подальшим аналізом мультипотентного потенціалу до диференціювання в умовах *in vitro* для ГСПК плаценти та пуповинної крові; здійснено кріоконсервування-розморожування тканини плаценти, виділено ГСПК із кріоконсервованої тканини і досліджено їхню колонієутворювальну здатність та імунофенотип; проведено FISH аналіз; статистично оброблені всі отримані результати, написано статтю.*

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. *Особисто здобувачем проведено всі виділення клітин із зрілої і фетальної плаценти та пуповинної крові, порівняно морфологію та імунофенотип ГСПК плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки, статистично оброблені всі отримані результати, написано статтю.*

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. *Особисто здобувачем проведено всі виділення клітин із зрілої і фетальної плаценти та пуповинної крові, проведено порівняльний аналіз фенотипів популяції гемопоетичних попередників плаценти та пуповинної крові із різним рівнем експресії CD34, статистично оброблені всі отримані результати, написано статтю.*

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, Ю.М. Шаблій, Прокопець Ю.К., Індиченко Т.М., Л.Л. Лукаш, Г.С. Лобинцева // *BiotechnologiaActa*. – 2014. – Т. 7 - №. 4 – С. 61–70. *Особисто здобувачем проведено всі виділення клітин із зрілої і фетальної плаценти та пуповинної крові; проведено порівняння експресії поверхневих маркерів для ГПК плаценти та пуповинної крові; здійснено кількісний аналіз мієлоїдних, еритроїдних та лімфоїдних попередників у різних джерелах; проведено культивування клітин плаценти та пуповинної крові із подальшим аналізом потенціалу до диференціювання *in vitro*, статистично оброблені всі отримані результати, написано статтю.*

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. *Особисто здобувачем проведено всі виділення клітин із зрілої і фетальної плаценти та пуповинної крові; проведено порівняльний аналіз експресії поверхневих маркерів для ГСПК плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки; проведено культивування клітин плаценти, пуповинної крові та визначено потенціал до диференціювання *in vitro*; проведено FISH аналіз; відзначено схожість і відмінність популяцій ГСПК різних джерел; статистично оброблені всі отримані результати, написано статтю.*

6. Кучма М.Д. Виявлення та 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. Світїна Г.М. Прокопець Ю.К., Індиченко Т.М., Цупіков О.М. , Л.Л. Лукаш , Г.С. Лобинцева // *BiotechnologiaActa*. – 2014. – Т. 7 - №3. – С. 60–68. *Особисто здобувачем проведено більшу частину робіт із культивування клітин нативної та кріоконсервованої пуповинної крові, плаценти та «мобілізованої» периферичної крові в напівтвердих культуральних середовищах; досліджено та описано новий тип колоній, проведено імунофенотипування клітин таких колоній; статистично оброблені всі отримані результати, написано статтю.*

7. Шаблій В.А. Кріоконсервирование 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. *Особисто здобувачем проведено кріоконсервування-розморожування тканини плаценти, виділення ГПК плаценти та їх культивування, фарбування колоній гемопоетичних клітин азур-еозином; статистично оброблені всі отримані результати, взято участь у написанні статті.*

8. 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. *Здобувачем проведено виділення ГСПК з кріоконсервованої плаценти, культивовано виділені клітини in vitro, написано текст патенту.*

9. Kuchma M. Cryopreserved human placental tissue as source of hematopoietic and mesenchymal stem cells / Maria Kuchma, Volodymyr Shablii, Vitaliy Kyryk, Anya Onishchenko, Galina Lobitseva // World cord blood congress III, Ryme, Italy, October 27–29, 2011. – P. 171. *Особисто здобувачем проведено кріоконсервування-розморожування тканини, виділення ГСПК, аналіз їх імунофенотипу, культивування та аналіз клоногенної активності; проведено статистичну обробку результатів.*

10. Shablii V. Characteristics of hematopoietic and mesenchymal stem cells isolated from cryopreserved human placental tissue / Shablii V, Kuchma M., Kyryk V., Onishchenko G., Lukash L., Lobitseva G., Martinenko S. // International Society for Stem Cell Research, 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June 13 – 16, 2012. – P. 95. *Особисто здобувачем проведено кріоконсервування-розморожування тканини, виділення ГСПК, аналіз їх імунофенотипу, культивування та аналіз потенціалу до диференціювання; проведено статистичну обробку результатів.*

11. Kuchma M. Isolation and characterization of hematopoietic stem cells from native and cryopreserved human placental tissue / Maria Kuchma, Volodymyr Shablii, Vitaliy Kyryk, Anya Onishchenko, Lubov Lukash, Galina Lobytseva // International Symposium on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology, Yalta, Ukraine, May 16 – 20, 2012. – P.118. *Особисто здобувачем проведено кріоконсервування-розморожування тканини, виділення ГСПК, аналіз їх імунофенотипу, культивування та аналіз потенціалу до диференціювання; проведено статистичну обробку результатів.*

12. Кучма М.Д. Сравнительная характеристика гемопоэтических прогениторных клеток, полученных из нативной и криоконсервированной ткани плаценты и пуповинной крови человека // М.Д. Кучма, В.А. Шаблий, В.М. Кирик, А.Н. Онищенко, Л.Л. Лукаш, Г.С. Лобынцева / Проблемы криобиологии Т.22, №3, 2012. –С.306. *Особисто здобувачем проведено кріоконсервування-розморожування тканини, виділення ГСПК, порівняльний аналіз їх імунофенотипу, культивування та порівняльний аналіз потенціалу до диференціювання; проведено статистичну обробку результатів.*

13. Kuchma M. Comparative characteristics of hematopoietic progenitor cells derived from native and cryopreserved placental tissue and umbilical cord blood / Maria Kuchma, Volodymyr Shablii, Vitaliy Kyryk, Anya Onishchenko, Lubov Lukash, Galina Lobytseva // Cell Technology Week 2013, Kyiv, Ukraine, May 14-17, 2013. – P 17. *Особисто здобувачем проведено кріоконсервування-розморожування тканини, виділення ГСПК, порівняльний аналіз їх імунофенотипу, культивування та порівняльний аналіз потенціалу до диференціювання; проведено статистичну обробку результатів.*

14. Kuchma M. Hematopoietic progenitor cells derived from native and cryopreserved placental tissue and umbilical cord blood: comparative analysis/ M. D. Kuchma, V.A. Shablii, V. M. Kyryk, G. M. Onishchenko, L.Lukash, G.Lobytseva.

// Biopolymers&Cell, VII Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine Dedicated to 175th anniversary of O.Y. Danilevsky 28-29 May 2013 Vol. 29 Special issue 2013. – P. 9 *Особисто здобувачем проведено кріоконсервування-розморожування тканини, виділення ГСПК, порівняльний аналіз їх імунофенотипу, культивування та порівняльний аналіз потенціалу до диференціювання; проведено статистичну обробку результатів.*

15. Kuchma M. Characteristics of hematopoietic stem/progenitor cells from placental tissue, umbilical cord blood and fetal liver / M. Kuchma, V Shablii, V Kyryk, H Svitina, Y Shablii, L Lukash, G Lobyntseva // The 3rd International Placenta Stem Cell Society meeting, Granada, Spain, September 10-12, 2014. – P 8. *Особисто здобувачем проведено кріоконсервування-розморожування тканини, виділення ГСПК плаценти та пуповинної крові, порівняльний аналіз імунофенотипу ГСПК різних джерел, культивування та порівняльний аналіз потенціалу до диференціювання; проведено статистичну обробку результатів.*

16. Kuchma M. Comparative analysis of immunophenotype and *in vitro* differentiation potential of hematopoietic progenitor cells from fetal hematopoietic tissues / M. Kuchma, V Shablii, V Kyryk, H Svitina, Y Shablii, L Lukash, G Lobyntseva // Biopolymers&Cell, VII Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine Dedicated Special issue 2014. – P. 11. *Особисто здобувачем проведено виділення ГСПК плаценти та пуповинної крові, порівняльний аналіз імунофенотипу клітин всіх джерел, культивування та порівняльний аналіз потенціалу до диференціювання; здійснено дослідження та характеристика ПЕК; проведено статистичну обробку результатів.*

17. Kuchma M. Hematopoietic stem/progenitor cells from human placental tissue, umbilical cord blood and fetal liver / M. Kuchma, V Kyryk, H Svitina, Y Shablii, L Lukash, G Lobyntseva, V Shablii // International Society for Stem Cell Research, 13th Annual Meeting, Stockholm, Sweden, June 24 – 27, 2015. – P. 227. *Особисто здобувачем проведено виділення ГСПК плаценти та пуповинної крові, порівняльний аналіз імунофенотипу клітин всіх джерел, культивування та порівняльний аналіз потенціалу до диференціювання; здійснено кріоконсервування-розморожування тканини плаценти та виділення із неї ГСПК; проведено FISH аналіз; здійснено статистичну обробку результатів.*

18. Kuchma M. Immunophenotype and colony-forming potential of hematopoietic stem/progenitor cells from human placental tissue, umbilical cord blood and fetal liver / Maria Kuchma, Vitaliy Kyryk, Hanna Svitina, Yulia Shablii, Lubov Lukash, Galina Lobyntseva, Volodymyr Shablii // Ukrainian Society of Cell Biology, Advances in cell biology, biotechnology, Lviv, Ukraine, October 11 – 13, 2015. – P. 82. *Особисто здобувачем проведено виділення клітин, порівняльний аналіз експресії поверхневих маркерів, культивування клітин плаценти та пуповинної крові, визначено потенціал до диференціювання *in vitro*, статистично оброблені отримані результати.*

АНОТАЦІЯ

Кучма М.Д. Порівняльна характеристика гемопоетичних стовбурових/ прогеніторних клітин плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки людини. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, 2015.

Проведено порівняльний аналіз ГСПК плацентарної тканини, пуповинної крові та фетальної печінки. Модифіковано методи виділення ГСПК із тканини плаценти та розроблено спосіб виділення ГСПК із кріоконсервованої тканини плаценти. Показано, що ГПК плаценти містять достовірно вищий відсоток комітованих прогеніторів та фенотипово більш гетерогенні, ніж такі клітини пуповинної крові, однак у порівнянні із ГПК фетальної печінки характеризуються нижчою кількістю комітованих попередників. Фетальні ГСПК зрілої плаценти мають подібну до ГСПК пуповинної крові здатність до мультилінійного диференціювання *in vitro*. Нами виявлено та описано новий тип колоній – плоскі еритроїдні. Отримані дані свідчать про проходження в зрілій плаценті активного гемопоезу, та перспективність плаценти як джерела ГСПК для застосування при лікуванні онкогематологічних захворювань та вроджених порушень кровотворення.

Ключові слова: гемопоетичні стовбурові і прогеніторні клітини (ГСПК), клітинні технології, диференціювання, кровоутворення, плацента, пуповинна кров, фетальна печінка.

АННОТАЦИЯ

Кучма М.Д. Сравнительная характеристика гемопоетических стволовых/ прогениторных клеток плаценты, пуповинной крови и фетальной печени человека. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2015.

Проведен сравнительный анализ ГСПК плацентарной ткани, пуповинной крови и фетальной печени. Модифицированы методы выделения ГСПК из ткани плаценты и разработан способ выделения ГСПК из кріоконсервированной ткани плаценты, основанный на быстрой ферментации ткани. Показано, что гемопоэтические прогениторные клетки плаценты фенотипически более гетерогенны, чем такие же клетки пуповинной крови и содержат популяции на разных стадиях дифференцировки, которые характеризуются иммунофенотипами: $CD34^{+low}CD45^{low/-}$, $CD34^{++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+++}CD45^{low/-}$, $CD34^{+low}CD45^{hi}$ и $CD34^{++}CD45^{hi}$. Содержание ГСПК

(CD34⁺CD45^{low}SSC^{low}) в ткани зрелой плаценты среди жизнеспособных CD45⁺ клеток составляло 0,56 % (0,39 – 0,76 %, n = 16). Плацентарные ГСПК характеризуются более высоким уровнем экспрессии CD90 и присутствием субпопуляции с высокой интенсивностью экспрессии CD31, при этом они не отличаются уровнем экспрессии CD133. ГПК зрелой плаценты содержат достоверно более высокий процент коммитированных предшественников (миелоидных CD34⁺CD45^{low}CD14⁺CD33⁺SSC^{low}, CD34⁺CD45^{low}CD14⁺SSC^{low} и эритроидных CD34⁺CD45^{low}CD235⁺SSC^{low}) по сравнению с ГПК пуповинной крови и достоверно более низкое количество миелоидных (CD34⁺CD45^{low}CD33⁺SSC^{low}) и лимфоидных (CD34⁺CD45^{low}CD7⁺SSC^{low}, CD34⁺CD45^{low}CD19⁺SSC^{low}) предшественников по сравнению с ГПК фетальной печени. Показано, что клетки мононуклеарной фракции зрелой плаценты при культивировании *in vitro* на 14 сутки роста образуют колонии всех типов: CFU-B, CFU-E, CFU-M, CFU-GM, CFU-GMEM в равных соотношениях, как и при культивировании ядродержащей фракции клеток пуповинной крови, что свидетельствует о схожем с ГСПК пуповинной крови потенциале к дифференцировке. В нашей работе с помощью FISH анализа подтверждено, что мультилинейные ГСПК плаценты имеют плодовое происхождение. ГСПК, полученные из криоконсервированной зрелой ткани, имеют схожие с ГСПК нативной ткани фенотипические характеристики и образуют такие же типы колоний *in vitro*. Нами обнаружен и описан новый тип колоний – плоские эритроидные колонии (ПЭК), которые наблюдаются при культивировании фракции мононуклеарных клеток плаценты, ядродержащих клеток пуповинной крови и «мобилизованной» периферической крови. 92 % клеток ПЭК экспрессируют CD235, что указывает на эритроидную природу колоний. Полученные данные свидетельствуют о прохождении в зрелой плаценте активного гемопоэза и перспективности плаценты как источника ГСПК для использования при лечении онкогематологических заболеваний и врожденных нарушений кроветворения не только с точки зрения дополнительного количества клеток, а также их фенотипической гетерогенности, что определяет функциональные свойства. На основе полученных нами данных рассчитано, что в среднем из одной плаценты можно получить $2,2 \times 10^6$ ($1,6 \times 10^6 - 3,0 \times 10^6$) ГСПК. Мы предполагаем, что использование ГСПК зрелой плаценты как дополнительного источника кроветворных клеток вместе с ГСПК пуповинной крови позволит устранить недостатки трансплантации клеток пуповинной крови, связанные с их низким содержанием и незрелостью прогениторов.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки (ГСПК), клеточные технологии, дифференцировка, кроветворение, плацента, пуповинная кровь, фетальная печень.

SUMMARY

Kuchma M.D. Characteristic of hematopoietic stem/progenitor cells derived from human placental tissue, cord blood and fetal liver. – Manuscript.

Thesis for a degree of Philosophy Doctor (PhD) in Biology, speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The comparative analysis of HSPCs from placental tissue, cord blood and fetal liver was conducted. The methods of isolation of HSPCs from the placental tissue were modified. The method of isolation of HSPCs from cryopreserved placental tissue was developed. We have shown that hematopoietic progenitors were more heterogeneous by their phenotype in compare to the cord blood. The HPCs compartment of the placenta versus the cord blood contained higher number of committed cells but their lower number compared to the fetal liver. HSPCs of the placenta and the cord blood origin possess similar potentials to the multilineage differentiation *in vitro*. The new type of flat erythroid colony was detected and described by us. Our data suggests that the active hematopoiesis occurs in the placenta and it is an additional source of HSPCs for treatment of oncohematological diseases and congenital hematologic disorders.

Keywords: hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC), cell technologies, differentiation, hematopoiesis, placenta, umbilical cord blood, fetal liver.

Підписано до друку 23.12.2015 р.
Наклад 100 прим.
Надруковано ТОВ «Олександріна»
м. Київ, вул. Антоновича, 180
тел. (044) 521-00-74.