

ОЦІНКА ПОТЕНЦІАЛУ ЕКСПАНСІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА КІСТКОВОГО МОЗКУ*

*При лікуванні важких захворювань гемопоетичної системи виникає потреба трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин. Основним об'єктом такої трансплантації є кістковий мозок, альтернативою є кордова кров. Результати проведених нами досліджень колонієутворюючої активності кровотворних клітин - попередників двостадійній тривалій культурі в дифузійних камерах *in vivo* свідчать про вищий проліферативний потенціал кровотворних клітин кордової крові порівняно з кістковим мозком. Це дає змогу говорити про більш високу здатність стовбурових клітин кордової крові до тривалого відновлення кровотворення і може бути пов'язане з наявністю в ній дуже ранніх клітин-попередників.*

Гематопоез є комплексним процесом, наслідком якого є утворення всіх клітин крові з плюрипотентних стовбурових клітин (СК) [1]. При порушеннях гемопоетичної та імунної систем використовують трансплантацію СК та клітин-попередників для відновлення кровотворення [2]. З 1939 р. основним об'єктом такої трансплантації є кістковий мозок (КМ), однак у зв'язку з нестачею матеріалу (тільки 25 % пацієнтів мають НЛ-сумісних донорів КМ [3]) виникає потреба в пошуку альтернативних джерел СК, серед яких найбільш перспективними є ембріональні тканини та кордова кров (КК), також відома як пуповинна кров [4]. Враховуючи морально-етичні та правові засади, трансплантація ембріональних клітин не може мати широкого застосування [5], тоді як, починаючи з 1988 р., КК все частіше застосовують при лікуванні гемопоетичної системи (за даними 2004 р., здійснено понад 3500 успішних трансплантацій КК [6]). Однак є деякі обмеження для такої трансплантації, зокрема, вважається, що КК, зібраної під час пологів, достатньо тільки

для трансплантації пацієнтам з масою тіла менше 40 кг, якщо виходити з кількості гранулярно-макрофагальних попередників у трансплантаті на 1 кг маси реципієнта. Водночас є дані про здійснення успішних трансплантацій КК дорослим реципієнтам масою до 98 кг [7]. Таким чином, потенціал експансії СК КК залишається до кінця не відомим [8]. Ситуацію ускладнює гетерогенність відділу ранніх клітин-попередників, адже згідно з новими дослідженнями найбільш ранніми попередниками є CD34⁺, фракція, яка взагалі раніше не розглядалась як джерело стовбурових клітин [9]. Отже, дуже важливо порівняти не стільки фенотип чи вміст детектабельних попередників у різних джерелах, а саме гемопоетичні активності клітин-попередників КК та КМ, причому зробити це не тільки *in vitro*, а й *in vivo*.

Частково оцінити потенціал експансії клітин КК та КМ можна, якщо використати довготривалу культуру популяції мононуклеарів цих джерел, у якій протягом визначеного періоду через рівні проміжки часу визначати колонієутворюю-

*Роботу виконано за підтримки Фонду фундаментальних досліджень Міністерства освіти і науки України.

ючу активність. Адже вважається, що СК містяться саме серед мононуклеарів, а довготривала культура розглядається як фізіологічна модель гематопоезу, в якій примітивні клітини-попередники і СК самовідновлюються.

Отже, нашою метою було оцінити у порівняльному аспекті репопулюючу здатність кровотворних клітин КМ і КК шляхом тривалого культивування *in vivo* для визначення потенційних можливостей СК з обох джерел відновлювати гемопоез при трансплантації.

Джерелом КМ були фрагменти ребер, отримані при торахтомії, та КК, отримана при пологах у здорових жінок віком від 20 до 30 років. Для експериментів використовували мишей лінії СВА масою 18-20 г, віком 4-5 місяців. Експерименти склалися з двох етапів і проводилися в культурі *in vivo*.

Метою першого етапу експерименту було одержати суспензійні культури клітин КМ та КК. Для культивування використовували дифузійні камери (ДК). Клітини очищали для отримання мононуклеарів, використовували сепарацію у градієнті густини лімфопрепу 1,077 г/мл. Життєздатність сепарованих клітин перевіряли за допомогою трипанового синього чи еозину (88-98 % у всіх експериментах).

Клітини КК та КМ розводили до необхідної концентрації і вводили у ДК. Як середовище для камер використовували живильне середовище RPMI (90 %), фетальну телячу сироватку FCS (10 %) та антибіотики (пеніцилін 100 Од і стрептоміцин 50 мкг/мл). По дві ДК з КК і КМ відповідно вшивали в черевну порожнину мишам. Протягом 4 тижнів кожні 7 днів забивали по 2 миші з ДК.

На другому етапі підраховували кількість клітин, отриманих із суспензійних культур, розводили їх до необхідної концентрації і вводили у ДК з RPMI (80 %), FCS (10 %), агаром Difco (10 %), антибіотиками та імплантували мишам. За добу до експерименту мишей обробляли цитостатиком циклофосфаном у дозі, адекватній опроміненню 5,0 Гр (500 рад), для пригнічення імунологічної реактивності організмів мишей і стимуляції колонієутворення.

Через 13 днів після імплантації ДК з агаровими культурами забивали мишей із кожної з двох груп і під інвертованим мікроскопом проводили облік результатів культивування.

Аналіз результатів 28-добового культивування суспензії мононуклеарів, отриманих з КМ і КК у паралельних дослідженнях, показав, що в обох випадках у культурах дифузійних камер підтримується гемопоез. Його ефективність оцінювали на 7-му, 14-ту, 17-ту, 21-шу і 28-му добу. Ми вибрали цю культуру, враховуючи той факт, що ге-

мопоетичні клітини-попередники в разі їх повноцінності повинні через два тижні проявити себе, утворюючи колонії-клони. Їх наявність у цей термін свідчить, що гемопоез у попередній культурі дійсно підтримується.

Аналіз культур КМ і КК з подальшою їх оцінкою у напіврідкому агарі показав, що у перші дні культивування культури майже не відрізняються одна від одної. Але вже у тижневий термін ефективність колонієутворення (ЕКУ) клітин з культур КК стає вища, ніж у культурі КМ ($27,0 \pm 1,2$ і $18,0 \pm 2,1$ на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин відповідно). Різниця між показниками статистичне вірогідна. Ще більшою виявилась відмінність між результатами досліджень у двотижневий термін. У той час, коли ЕКУ клітин з культур КМ дорівнювала $42,0 \pm 1,2$, клітини КК виявилися здатними сформувати утрічі більше колоній. Варто зауважити, що на 17-й день культивування в обох випадках спостерігалось пригнічення колонієутворюючої активності. Це збігається з часом, коли колонії стають дифузійними і клітини мігрують від зони проліферації так далеко, що колонії перестають існувати. На 21-й день культивування ЕКУ КМ дорівнювала $31,0 \pm 1,3$, а КК - $104,0 \pm 4,3$ колоній на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин. Новий сплеск колонієутворення може бути пов'язаний з формуванням більш ранніх колоній, ніж попередні. Подібну ситуацію можна спостерігати у процесі колонізації селезінки летально опроміненних мишей, за Till і McCulloch (1963), коли колонії, які виникли, на 11-й день зникають, а на 16-й день з'являються нові. Цей феномен дослідники пояснюють гетерогенністю клітин-попередників, які формують колонії залежно від їхнього віку. Примітивніші попередники починають проявляти проліферативну активність пізніше, ніж ті, що ієрархічно знаходяться ближче до морфологічно ідентифікованих клітин. Проводячи таку паралель, можна припустити, що у нашому випадку склалася така ж ситуація, коли спочатку колонії формувалися більш «зрілими» клітинами-попередниками, а пізніше - більш примітивними. Ця думка підтверджується тим, що кровотворні попередники з обох джерел поводити себе ідентично, тобто тенденція в обох випадках була така ж сама, хоча ефективність колонієутворення була різною.

Підтверджують наявність примітивних попередників у КК і цитологічні дослідження, які показали, що відсоток молодих проліферуючих і дозріваючих гранулоцитів у клонах КК значно вищий, ніж у клонах КМ (69 % і 24 % відповідно). Ці результати узгоджуються і з даними наукових досліджень, за якими клітини кордової

крові частіше, порівняно з кістковим мозком, мають морфологію незрілих клітин [10].

Таким чином, на основі аналізу результатів двостадійного культивування клітин-попередників КК і КМ виявлено особливості у формуванні клонів мононуклеарами кордової крові і кісткового мозку у довготривалій культурі. Більший

проліферативний потенціал виявлено у кровотворних клітин КК.

Дані нашого дослідження свідчать, що при трансплантації ефект дії меншої дози клітин КК може бути вищим, ніж клітин КМ, завдяки їх високому проліферативному потенціалу і можливій наявності більш ранніх клітин-попередників.

І. Глузман Д. Ф., Абраменко І. В., Склярєнко Л. М., Надгорная В. А. Лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний.-К.: Морион.- 1998. -336 с.

І. Юрасов С. В., Владимирская Е. Б., Румянцев А. Г., Мур С. Выделение гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови человека для трансплантации // Гематология и трансфузиология-1997-№2-С. 10-15.

3. *Chantal S. L., Thomas J. N.* Hematopoietic stem cell transplantation: a primer for the primary care physician // CMAJ.- 2004,- V. 170,-№ 10.-P. 1569-1577.

4. *Huang S., Law P., Young D.* et al. Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood vs. adult bone marrow and mobilized peripheral blood//Exp. Hematol,-1998-V. 12.- P. 1162-1171.

5. *McLaren A.* Ethical and social considerations of stem cell research // Nature,-2001.-V. 414.-P. 129-131.

6. Cloning. Alternative to embryonic stem cell research offered // Blood Weekly.-2004,-April 15,-P. 13.

7. *Владимирская Е. Б., Замараева Н. В., Вольнец М. В.* и др. Пуповинная кровь - альтернативный источник стволовых кроветворных клеток для трансплантации // Педиатрия.- 1997-№4-С. 9-12.

8. *Broxmeyer H. E., Hangoc G., Cooper S.* et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1992.- V. 89.- P. 4109-4113.

9. *Nakamura Y., Ando K., Chargui J.* et al. Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells // Blood-1999.- V. 94.- № 12.- P. 4053-4059.

10. *Tetsuya M., Mitsuoki E., Hidemitsu K.* et al. Ultrastructural and cytochemical characterization of human cord blood cells // Med. Electron. Microsc.- 2002.- V. 35.- P. 96-101.

N. Bilko, O. Doroshenko

ASSESSMENT OF THE EXPANSION POTENTIAL OF CORD BLOOD AND BONE MARROW STEM CELLS

Hematopoietic stem cells transplantation is often used, when treating severe diseases of the hematopoietic system. Bone marrow is the main object for such transplantation, while cord blood is an alternative. It is unknown, whether stem cells from these sources are equal in their ability to long-term hematopoietic renewal in the recipient's organism. The results of our investigation of the hematopoietic progenitors colony forming activity in two-step culture in the diffusion chambers in vivo testify to the higher proliferative potential of cord blood hematopoietic cells, if compared to bone marrow. This may indicate the higher capacity of cord blood stem cells to long-term hematopoietic renewal, and may be related to the existence of the very early progenitors in it.