

ВИЯВЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛОСКИХ ЕРИТРОЇДНИХ КОЛОНІЙ У НАПІВТВЕРДИХ КУЛЬТУРАЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

М. Д. Кучма^{1, 2}

В. А. Шаблій^{1, 2}

В. М. Кирик³

Г. М. Світін²

Ю. К. Прокорець²

Т. М. Індиченко²

О. М. Цупіков³

Л. Л. Лукаш¹

Г. С. Лобинцева²

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

²ТОВ «Інститут клітинної терапії», Київ, Україна

³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН»,
Київ, Україна

E-mail: kuchma@gmx.com

Отримано 25.02.2014

За культивування ядровмісних клітин пуповинної крові, плаценти та «мобілізованої» периферичної крові в напівтвердих культуральних середовищах утворюються плоскі еритроїдні колонії. На 14-ту добу культивування вони можуть формувати один або декілька червоних агрегатів та досягати великих розмірів, що свідчить про їхню високу проліферативну активність і подібність до гранулоцитарних, еритроцитарних, моноцитарно/макрофагальних, мегакаріоцитарних колонієутворювальних одиниць. Нами було встановлено, що 92% клітин плоских колоній експресують CD235, що вказує на їх належність до еритроїдного клітинного ростка, однак морфологія відрізняється від еритроїдних бурстоутворювальних та еритроїдних колонієутворювальних одиниць. Імовірність появи їх у метилцелюлозовмісному середовищі становить $2,5\% \pm 1\%$, що достовірно нижче, ніж в агарвмісному, — $58\% \pm 4,8\%$. Таким чином, за підрахунку та класифікації після культивування в напівтвердому культуральному середовищі плоскі колонії варто або виділяти в окрему групу, або, з огляду на низьку ймовірність їх появи в метилцелюлозовмісному середовищі, відносити до еритроїдних бурстоутворювальних одиниць.

Ключові слова: еритроїдні колонії, колонієутворювальна активність, пуповинна кров, плацента, мобілізована периферична кров.

Визначення колонієутворювальної активності є одним із найбільш поширених методів для обчислення кількості функціональних гемопоетичних клітин-попередників у таких тканинах, як пуповинна кров, кістковий мозок та мобілізована периферична кров. Визначаючи колонієутворювальну активність, оцінюють кількість різних типів колоній у напівтвердому культуральному середовищі після посіву певної кількості клітин. Відносний вміст різних типів колонієутворювальних одиниць дає інформацію про здатність до проліферації та диференціювання (у гранулоцитарному, моноцитарному, еритроїдному та мегакаріоцитарному напрямках) [1]. Однак іноді за культивування можуть траплятися колонії, які важко класифікувати без використання додаткових методів дослідження. Так, ми спостерігали наявність плоских еритроїдних колоній

(ПЕК), опис яких відсутній у відповідній доступній літературі з визначення морфології колоній у напівтвердому середовищі під час культивування кровотворних клітин [2]. Метою роботи було охарактеризувати ПЕК та встановити фенотип клітин, які утворюють їх у напівтвердому культуральному середовищі з подальшим визначенням належності до певного типу колоній методом візуалізації на «живих» препаратах з використанням мікроскопа, без додаткових аналізів.

Матеріали і методи

Виділення фракції ядровмісних клітин (ЯК) із пуповинної крові та тканини зрілої плаценти

Пуповинну кров, зібрану за стандартною методикою, та плаценту одержували після пологів (фізіологічних або шляхом кесаре-

вого розтину) на 39–41-му тижні вагітності у 23–36-річних жінок за їхньою інформованою згодою. Пуповинну кров і тканину плаценти тестували на наявність аеробних, анаеробних бактерій, а також грибкової інфекції.

Для отримання ЯК до пуповинної крові додавали розчин 6% -го гідроксietилкрохмалю та седиментували за кімнатної температури до чіткого розділення фракції еритроцитів і ЯК, після чого фракціонували й центрифугували при 400 g протягом 20 хв. Осад клітин ресуспендували у вихідному розчині.

Для виділення клітин із плаценти очищали її від амніотичної оболонки і відрізали пуповину. Плацентарну тканину подрібнювали стерильними ножицями на фрагменти 1–3 мм, які промивали розчином Хенкса для видалення залишків крові до повного знебарвлення розчину. Потім тканину обробляли розчином ензимів: 0,2% колагенази I (Serva, Німеччина), 0,35 мг/мл гіалуронідази (Sigma, США), 100 од/мл DNase I (Sigma, США) з додаванням 1 мг/мл BSA упродовж 30–50 хв за +37 °C. Після цього плацентарні клітини одержували шляхом фільтрування суспензії через клітинний фільтр із діаметром пор 70 мкм (Becton Dickinson, США). Клітини після ензимації відмивали у фосфатно-сольовому буферному розчині, додаючи 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, центрифугуванням суспензії при 300 g протягом 10 хв та суспендуванням у тому самому розчині. Тканину, що залишалась, інкубували зі свіжою порцією ензимів протягом 30–60 хв при +37 °C. Клітини також відмивали і об'єднували. Фракцію ЯК одержували фракціонуванням на фіколі (щільність 1,077 г/мл, Biochrome, Німеччина), двічі відмивали від фіколу, фільтрували через клітинний фільтр з діаметром пор 40 мкм.

«Мобілізована» периферична кров

Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) отримували із проб периферичної крові пацієнтів з гострими нелімфобластними лейкозами, яким було проведено попередню процедуру мобілізації ГСК з використанням відповідних мобілізуючих агентів і подальшим збором клітин CD34⁺ за стандартною методикою.

Кріоконсервування пуповинної крові

До суспензії ЯК, яку одержували вище-описаним методом, повільно додавали розчин 10% ДМСО (Sigma, США) до кінцевої концентрації 5%, розливали в кріоампули і проводили кріоконсервування за програ-

мою, наведеною в [3], за допомогою приладу програмного заморожувача ЗП-6.00.00.00. За температури –140 °C процес охолодження в програмному заморожувачі зупиняли й переносили матеріал у рідкий азот (–196 °C) на довгострокове зберігання. Розморожування здійснювали на водяній бані (від +38 до +40 °C) до появи в кріоампулі рідкої фази (0 °C).

Культитивування фракції ЯК пуповинної крові, плаценти та «мобілізованої» периферичної крові в метилцелюлозовмісному й агарвмісному середовищах

Для дослідження колонієутворювальної здатності плаценти та «мобілізованої» периферичної крові культивували нативні зразки. З метою аналізу колоній ЯК пуповинної крові культивували нативні та кріоконсервовані зразки. Кріоконсервовані ЯК пуповинної крові розморожували, як описано вище, і відмивали від кріопротектора шляхом додавання до суспензії клітин з кріопротектором розчину 2,5% -го альбуміну людини (Біофарма, Україна) та 5% -го декстрану 40 (Юрія-Фарм, Україна) у розчині хлориду натрію 0,9%, дуже повільно, краплинами, до кінцевої концентрації ДМСО 2,5%. Суспензію центрифугували при 300 g протягом 10 хв. Клітини підраховували у камері Горяєва. Потім культивували їх у кількості $5 \cdot 10^4$ на чашку Петрі діаметром 35 мм у дублікатах в метилцелюлозовмісному середовищі MethoCult (Stem Cell Technologies, Канада) або в агарвмісному середовищі при 37 °C в атмосфері з 5% CO₂. Агарвмісне середовище містило такі компоненти: середовище AIM-V (Gibco, Німеччина), 50 нг/мл SCF, 10 нг/мл G-CSF, 10 нг/мл GM-CSF, 10 нг/мл IL-3, 9 нг/мл Epo (Biochrom, Німеччина), 30% ФБС (Gibco, Німеччина) та 0,3% агару.

Проводили спостереження за ростом колоній до 21-ї доби культивування за допомогою інвертованого мікроскопа СКХ41 (Olympus, Японія).

Проточна цитометрія

Для імунофенотипування клітин ПЕК пуповинної крові на 15-ту добу культивування ізолювали колонії з агарвмісного культурального середовища за допомогою піпеткового дозатора під інвертованим мікроскопом, відмивали в культуральному середовищі альфа-МЕМ та буфері Cell Wash (BD, США), інкубували при +4 °C протягом 30 хв із первинними моноклональними антитілами в робочій концентрації 0,5 мкг на 10^6 клітин. При цьому використовували такі флуорохром-мічені моноклональні антитіла

(Becton Dickinson, США), як anti-CD33 FITC, anti-CD235a PE та anti-CD14 Pacific Blue. Не зв'язані антитіла відмивали в буфері Cell Wash. Аналізували лише популяцію живих клітин, які не забарвлювались барвником 7-AAD. Імунофенотипування проводили із застосуванням лазерного проточного цитофлуориметра-сортера BD FACSAria (Becton Dickinson, США) і спеціальної програми FACS Diva 6.1.2, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 3 параметри флуоресценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів за багатопараметричного аналізу використовували контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним із антитіл окремо (single stained control) та зразки з комбінацією декількох антитіл без одного (fluorescence minus one control).

Імуноцитохімічні дослідження

Для проведення імуноцитохімічного аналізу клітин ПЕК пуповинної крові на 14-ту добу культивування ізолювали колонії із агарвмісного середовища за допомогою піпеткового дозатора під інвертованим мікроскопом і наносили у вигляді мазка на предметне скло, висушували та фіксували забуференим розчином 4% -го параформальдегіду впродовж 15 хв. Неспецифічне зв'язування антитіл блокували інкубуванням цитопрепаратів за кімнатної температури в розчині 0,1 М фосфатного буфера, що містив 0,5% сироваткового альбуміну бика. Для детекції глікофору А використовували флуорохром-мічені моноклональні антитіла anti-CD235a PE (Becton Dickinson, США) і для посилення сигналу візуалізації проводили зв'язування первинних антитіл зі вторинними антитілами goat anti mouse-Alexa 488 (Invitrogen, Німеччина). Контролем слугували цитопрепарати, які після блокування не інкубували з антитілами anti-CD235a PE, а витримували зі вторинними антитілами goat anti mouse-Alexa 488. Візуалізували зображення на конфокальному лазерному сканувальному мікроскопі FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

Статистичний аналіз

Результати подано у вигляді середніх величин з 95%-м довірчим інтервалом. Статистичну значущість відмінностей між вибірками визначали за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Середню помилку розраховували шляхом встановлення достовірності відмінностей за альтернативного варіювання. Для визначення статистичної значущості

відмінностей з'ясовували, чи розрізняються суттєво відносні частоти появи подій.

Результати та обговорення

Під час культивування клітин пуповинної крові, плаценти та мобілізованої периферичної крові в напівтвердому середовищі спостерігали всі характерні для клітин крові типи колоній, зокрема колонії еритроїдних попередників: BFU-E (бурстоутворювальні еритроїдні одиниці), CFU-E (колонієутворювальні еритроїдні одиниці); колонії попередників гранулоцитів та моноцитів: CFU-M (колонієутворювальні макрофагальні одиниці), CFU-G (колонієутворювальні гранулоцитарні одиниці), CFU-GM (колонієутворювальні гранулоцитарні та макрофагальні одиниці) і змішані колонії: CFU-GEMM (колонієутворювальні гранулоцитарні, еритроцитарні, моноцитарно/макрофагальні, мегакаріоцитарні одиниці). Окрім таких колоній, у культурі ЯК пуповинної крові, плаценти та мобілізованої периферичної крові були наявні ПЕК (рис. 1, б).

ПЕК виявляли в $58\% \pm 4,8\%$ ($n = 108$) випадках культивування як нативної, так і кріоконсервованої пуповинної крові в агарвмісному середовищі. Однак за культивування нативної або кріоконсервованої пуповинної крові в метилцелюлозовмісному середовищі ($n = 238$) імовірність появи ПЕК, на відміну

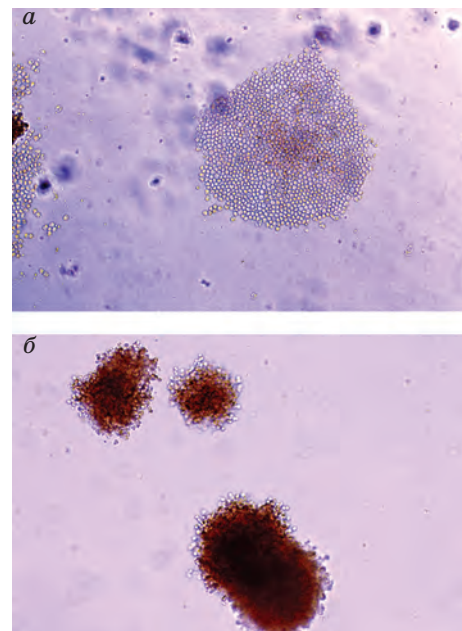


Рис. 1. ПЕК (а) та CFU-B (б) нативної пуповинної крові в агарвмісному напівтвердому середовищі 14-та доба культивування, світлова мікроскопія, ок. $\times 10$, об. $\times 10$

від агарвмісного середовища, була достовірно нижчою ($P = 0,0006$) і становила $2,5\% \pm 1\%$. Розрахунок ймовірності появи таких колоній проводили разом 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 у культурі нативної ($n = 138$) та кріоконсервованої ($n = 108$) пуповинної крові в метилцелюлозовмісному середовищі ($P = 0,0006$) і нативної ($n = 54$) та кріоконсервованої ($n = 44$) пуповинної крові в агарвмісному середовищі ($P = 0,0006$). Відносна кількість ПЕК ЯК пуповинної крові не залежала від складу середовища і становила $4,4\%$ ($0,9\text{--}10,6\%$) ($n = 6$) у метилцелюлозовмісному середовищі

та $3,6\%$ ($2,1\text{--}5,6\%$) ($n = 58$) в агарвмісному середовищі, однак в окремих випадках кількість їх досягала майже 50% . При цьому відносна кількість ПЕК пуповинної крові була достовірно вищою ($P < 0,01$), ніж кількість CFU-GEMM, відсоток яких становив $1,7$ ($0,6\text{--}3,5\%$, при $n = 20$). Відносна кількість ПЕК плацентарної тканини в агарвмісному середовищі дорівнювала $16,2\%$ ($7,3\text{--}27,7\%$, $n = 4$).

За культивування ПЕК пуповинної крові, плаценти або мобілізованої периферичної крові на дні культуральних чашок утворювалися кластери, що складалися з 3–12 клітин, які розміщувалися поодинокі на невеликій відстані або утворювали так звані поля вже на 7-му добу (рис. 2, а), що могли досягати великих розмірів порівняно з колоніями інших типів. Уже на початку культивування

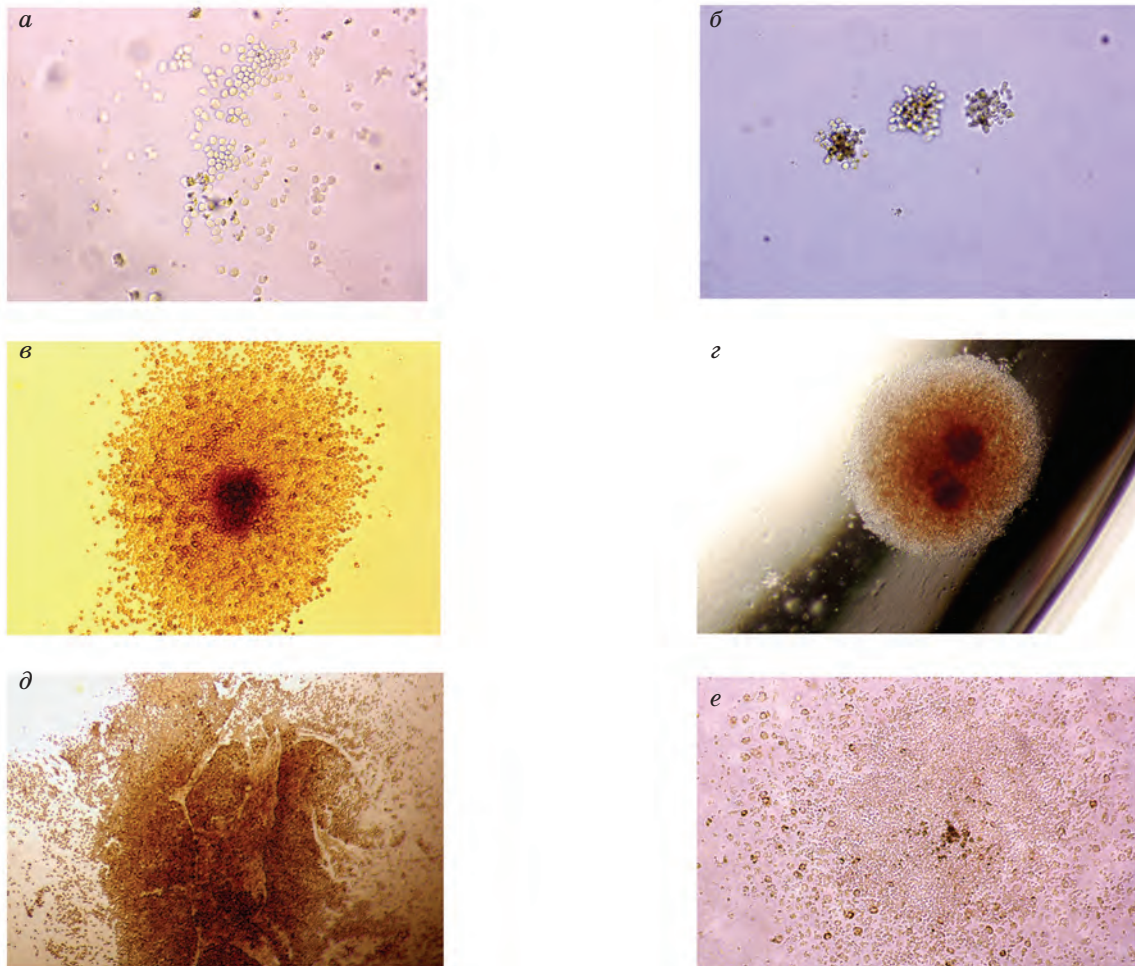


Рис. 2. Колонії клітин нативної пуповинної крові в агарвмісному напівтвердому середовищі (світлова мікроскопія):

- а — ПЕК;
- б — еритроїдна або міелоїдна колонія, 7-ма доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 10$;
- в — ПЕК з одним агрегатом, 14-та доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 10$;
- г — ПЕК із двома агрегатами, 14-та доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 5$;
- д — велика колонія у вигляді поля, 14-та доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 5$;
- е — зруйновані клітини ПЕК, 17-та доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 10$

такі кластери добре помітні й відрізняються від усіх інших кластерів (рис. 2, б). На 14-ту добу культивування вони, як правило, мають правильну округлу форму і чітко окреслені краї (рис. 1, а). Клітини в колонії щільно прилягають одна до одної. На цей час у структурі колонії можуть утворюватись один (рис. 2, в) або декілька агрегатів (рис. 2, з), які мають червоне забарвлення. У деяких випадках такі колонії перетворювались на величезні поля клітин (рис. 2, д). Вже на 17-ту добу культивування клітини починали руйнуватися (рис. 2, е).

Під час культивування ЯК пуповинної крові в метилцелюлозовмісному середовищі, а також ЯК кріоконсервованої пуповинної

крові, клітин плаценти та мобілізованої периферичної крові в агарвмісному середовищі ПЕК утворюються у такий спосіб, як описано вище, і мають такий самий вигляд, як ПЕК нативної пуповинної крові в агарвмісному середовищі (рис. 3).

Оскільки ймовірність виявлення ПЕК була більшою в агарвмісному середовищі, дослідження імунофенотипу таких колоній проводили в культурі ЯК нативної пуповинної крові з використанням середовища, до складу якого входив агар. Результати проточної цитометрії клітин, ізольованих з ПЕК, показали, що 92% клітин експресують CD235 (рис. 4, а). При цьому 80,8% клітин мали фенотип $CD235^+CD33^-CD14^-$. Були

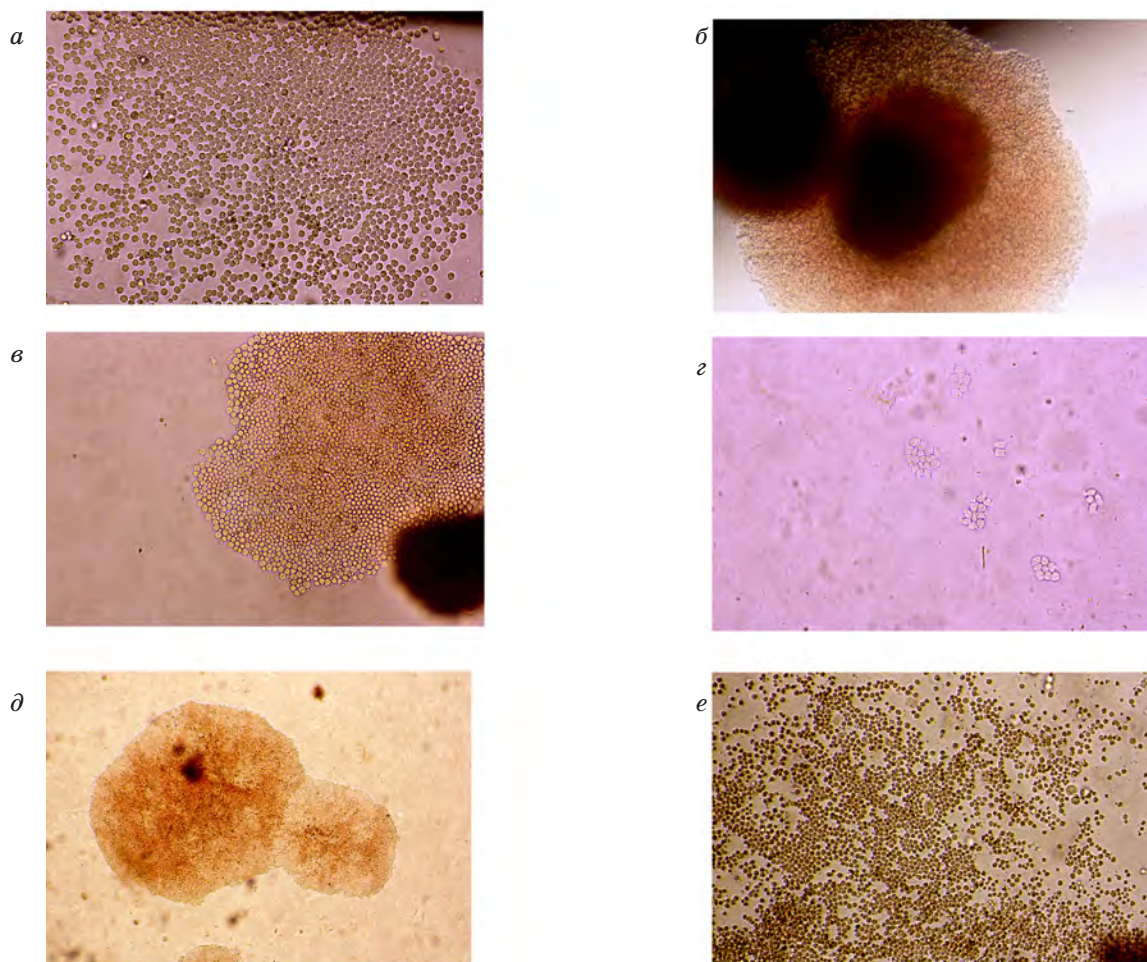


Рис. 3. Утворення ПЕК ЯК пуповинної крові в метилцелюлозовмісному середовищі, а також ЯК кріоконсервованої пуповинної крові, клітин плаценти та мобілізованої периферичної крові в агарвмісному середовищі (світлова мікроскопія):

- а — ПЕК нативної пуповинної крові в метилцелюлозовмісному середовищі, 14-та доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 10$;
 б — ПЕК з одним агрегатом, ок. $\times 10$, об. $\times 5$ нативної пуповинної крові в метилцелюлозовмісному середовищі, 14-та доба культивування;
 в — ПЕК клітин кріоконсервованої пуповинної крові, 14-та доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 10$;
 з — початок утворення ПЕК клітин плацентарної тканини, 5-та доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 10$;
 д — колонія ПЕК з агрегатом клітин плацентарної тканини, 14-та доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 5$;
 е — ПЕК клітин «мобілізованої» периферичної крові, 14-та доба культивування, ок. $\times 10$, об. $\times 5$

також присутні клітини, що мали фенотип $CD235^+CD33^+CD14^+$ у кількості 5,2%, і клітини з фенотипом $CD235^+CD33^-CD14^+$ у кількості 4,9% та 1% клітин $CD235^+CD33^+CD14^-$. Клітини з таким фенотипом трапляються також у популяціях нативної пуповинної крові (рис. 4, в) і плацентарної тканини (рис. 4, з). Ми виявили серед аналізованих клітин 13% таких, що експресували CD33, та 16,9% — із експресією CD14, при цьому 11,6% мали фенотип $CD33^+CD14^+$, 5,4% — фенотип $CD33^-CD14^+$ і 1,8% — фенотип $CD33^+CD14^-$ (рис. 4, б).

Результати імуноцитохімічного дослідження показали, що ПЕК без агрегатів, які росли в культурі ЯК нативної пуповинної крові в агарвмісному середовищі, експресують CD235 (рис. 5).

У роботі описано ПЕК, що трапляються за культивування ЯК пуповинної крові, плаценти та «мобілізованої» периферичної крові

в напівтвердому середовищі. У разі класифікації колоній з використанням світлового мікроскопа ПЕК схожі на CFU-GEMM, оскільки мають великі розміри і можуть містити агрегат еритроїдних клітин. CFU-GEMM — колонії, які частіше містять в центрі еритроїдні клітини, а також гранулоцити, макрофаги, мегакаріюцити, 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, трапляються відносно рідко і в більшості зразків присутні в кількості менше 10% [4, 5]. Однак проведені нами дослідження показали, що ПЕК не належать до CFU-GEMM. Про це свідчить більша кількість ПЕК у культурі, ніж CFU-GEMM, а в окремих культурах відносна кількість ПЕК сягає майже 50%, що не характерно для колоній CFU-GEMM.

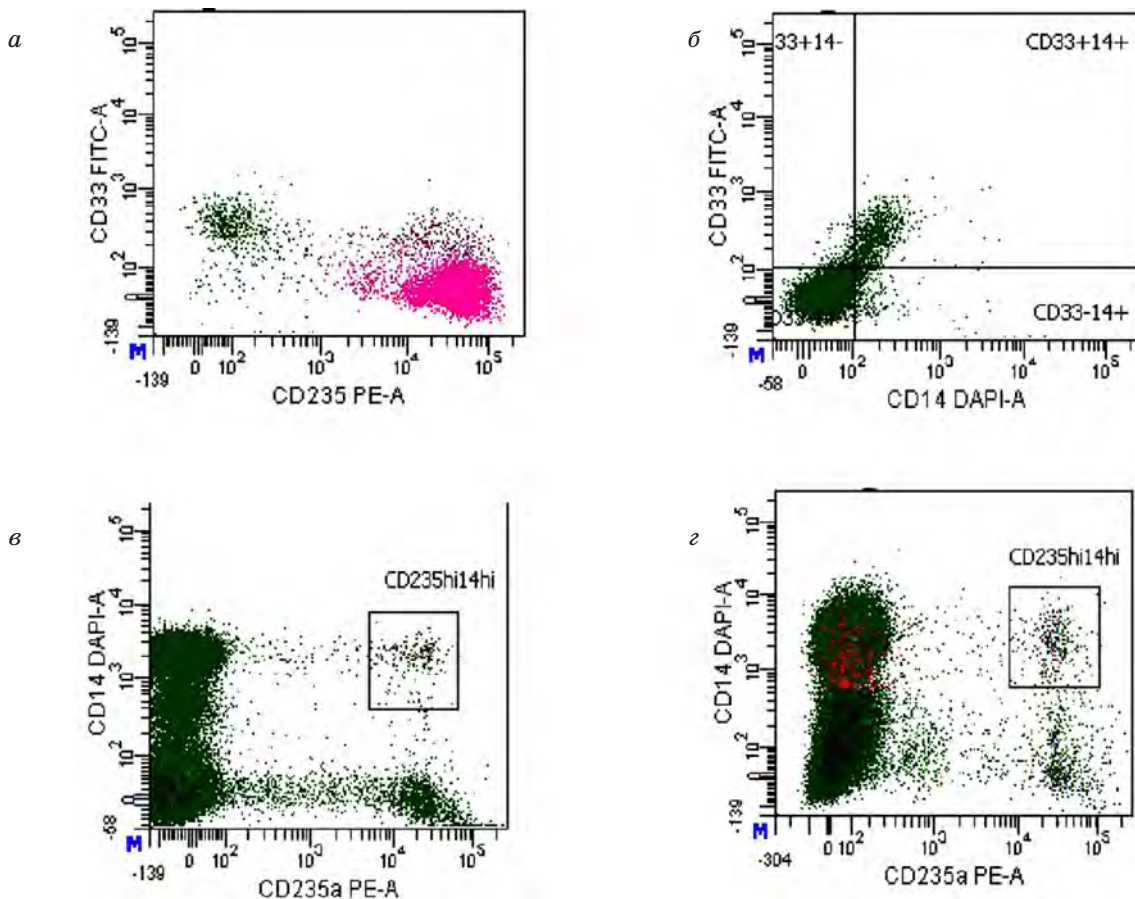


Рис. 4. Двовимірні гістограми експресії поверхневих маркерів:

- а — CD235 та CD33 на клітинах ПЕК нативної пуповинної крові на 15-ту добу культивування в агарвмісному середовищі;
 б — CD14 та CD33 на клітинах ПЕК нативної пуповинної крові на 15-ту добу культивування в агарвмісному середовищі;
 в — CD235 і CD14 на нативних клітинах пуповинної крові та плаценти;
 з — CD235 і CD14 на нативних клітинах плаценти;
 на осях позначено інтенсивність флуоресценції на відповідних каналах (програма BD FACSDiva 6.1.2)

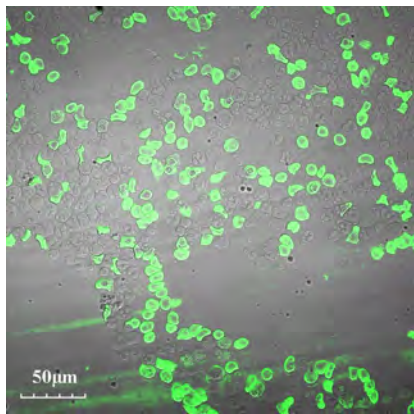


Рис. 5. Виявлення експресії CD235 на поверхневій мембрані клітин ПЕК без агрегатів у культурі ЯК пуповинної крові в агарвмісному середовищі (комбінація флуоресцентної мікроскопії та фазового контрасту)

Природу ПЕК було встановлено за допомогою проточної цитометрії та імуноцитохімічного аналізу. Клітини, які було нами проаналізовано методом проточної цитометрії, ізолювані переважно з колоній, які не містили яскраво вираженого еритроїдного агрегату. Значна кількість клітин експресувала CD235. Як відомо, CD235 (Glycophorin A) експресується на зрілих еритроцитах [6] та на примітивних фетальних еритроїдних клітинах [7]. Серед аналізованих клітин у незначній кількості були присутні клітини, що експресували CD33 та/або CD14. Відомо, що CD33 — один із маркерів, що характерний для клітин ранньої стадії диференціювання в мієлоїдному напрямі [8, 9]. CD14 вважають мієлоїдним маркером, він з'являється на моноцитах на більш пізніх стадіях дозрівання, експресується на базофілах і нейтрофілах [10, 11]. CD14 також експресується на початкових та проміжних етапах диференціювання дендритних клітин [12].

Таким чином, більша частина аналізованих клітин ПЕК були еритроїдними, а ті мієлоїдні клітини, які ми виявили під час аналізу ПЕК, можуть бути макрофагами та їхніми попередниками, які, як відомо, підтримують еритропоєз у гемопоетичних тканинах [13–15]. Не виключено, що ці клітини могли потрапити із сусідніх колоній за відбору ПЕК. Цікаво, що аналізовані клітини містили невелику кількість таких клітин з фенотипами $CD235^+CD33^+CD14^+$, $CD235^+CD33^-CD14^+$ та $CD235^+CD33^+CD14^-$. Нами також встановлено, що наявність клітин з таким фенотипом є характерною для нативної пуповинної крові та тканини плаценти. Відомо, що еритроїдна і мієлоїдна лінія диференцію-

вання мають спільні клітини-попередники. Так, $CD133^+$ клітини кісткового мозку в умовах культивування утворюють клітини, що коекспресують CD13 та CD36 і мають здатність до диференціювання в еритроїдному та мієлоїдному напрямках залежно від наявності відповідних факторів росту [16]. Тож можливо, що ПЕК або містять такі мієлоеритроїдні прогенітори, або ж вони потрапили до аналізованих клітин із сусідніх колоній.

Для підтвердження еритроїдної природи таких колоній імуноцитохімічним аналізом було досліджено клітини ПЕК, які не містили еритроїдного агрегату, і виявлено експресію CD235 на аналізованих клітинах. Це дає підстави стверджувати, що ПЕК, які трапляються за культивування ЯК пуповинної крові, плаценти та мобілізованої периферичної крові в напівтвердому середовищі, є еритроїдними. Однак морфологія ПЕК суттєво відрізняється від BFU-E та CFU-E. CFU-E — невеликі колонії у вигляді одного або двох кластерів червоного чи 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 [17, 5]. Нами було показано, що ПЕК здатні перетворюватися на величезні поля клітин; це свідчить про високу проліферативну активність клітин-попередників, які утворюють такі колонії, а отже, про те, що вони можуть бути дуже ранніми прогеніторами. Тому слід вважати, що в разі визначення 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.

Плацентарна тканина, як і пуповинна та мобілізована периферична кров, містить прогенітори, з яких утворюється ПЕК. Наше спостереження щодо подібності росту еритроїдних ПЕК, утворених клітинами плаценти, пуповинної та «мобілізованої» периферичної крові, показує схожість гемопоетичних прогеніторних клітин із різних джерел. Аналогічні дані в доступній літературі не описано. Вони мають значення у зв'язку з тим, що плаценту почали розглядати як можливе додаткове джерело гемопоетичних прогеніторних клітин [18–20], оскільки існує дефіцит донорів цих клітин для трансплантацій. Тож актуальним є порівняння властивостей гемопоетичних прогеніторних клітин плаценти з властивостями таких клітин, ізолюваних з

інших джерел, для оцінки можливостей їх клінічного застосування [21].

Таким чином, показано, що під час культивування ЯК пуповинної крові, плаценти та мобілізованої периферичної крові в напівтвердому середовищі утворюються ПЕК, які складаються з клітин, що ростуть в одній площині й можуть утворювати один або декілька агрегатів на 14-ту добу культивування. ПЕК можуть досягати великих розмірів, тому клітини, які їх утворюють, є ранніми прогеніторами. 92% клі-

тин ПЕК експресують CD235, що свідчить про належність колоній до еритроїдних. За підрахунку та класифікації колоній після культивування в напівтвердих середовищах імовірність появи їх у метилцелюлозовмісному середовищі достовірно нижча, ніж в агарвмісному ($2,5\% \pm 1\%$). Отже, ПЕК варто або виділяти в окрему групу, або, з огляду на низьку ймовірність появи їх у метилцелюлозовмісному середовищі, відносити до BFU-E, оскільки вони утворені з ранніх еритроїдних прогеніторів.

REFERENCES

1. Sarma N. J., Takeda A., Yaseen N. R. Colony Forming Cell (CFC) Assay for Human Hematopoietic Cells. *J. Visual. Experim.* 2010, (46). Doi: 10.3791/2195.
2. Nissen-Druey C., Tichelli A., Meyer-Monard S. Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol.* 2005, 113(1), 5–96.
3. Pat. UA 46673 A. Method of the human hematopoietic cells preserving. Lobintseva G. S. Appl. 14.01.2002; Published 15.05.2002, Bull. № 5.
4. Ash R. C., Detrick D. A., Zanjani E. D. Studies of human pluripotential hemopoietic stem cells (CFU-GEMM) in vitro. *Blood.* 1981, 58 (2), 309–16.
5. *Stem cell technology*. Identification of Colonies Derived from Human Hematopoietic Progenitors. *Manual for using MethoCult*. 1–2.
6. Loken M. R., Shah V. O., Dattilio K. L., Civin C. I. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood.* 1987, 69 (1), 255–263.
7. Klimchenko O., Mori M., Distefano A., Langlois T., Larbret F., Lecluse Y., Feraud O., Vainchenker W., Norol F., Debili N. A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood.* 2009, 114 (8), 1506–17.
8. Gaipa G., Coustan-Smith E., Todisco E., Maglia O., Biondi A., Campana D. Characterization of CD34⁺, CD13⁺, CD33⁺ cells, a rare subset of immature human hematopoietic cells. *Haematologica.* 2002, 87 (4), 347–56.
9. Carvalho J. M., Souza M. K., Buccheri V., Rubens C. V., Kerbaui J., Oliveira J. S. CD34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogenic donors. *San Paulo Med. J.* 2009, 127(1), 12–8.
10. Terstappen L. W., Hollander Z., Meiners H., Loken M. R. Quantitative Comparison of Myeloid Antigens on Five Lineages of Mature Peripheral Blood Cells. *J. Leukoc. Biol.* 1990, 48 (2), 138–48.
11. Antal-Szalmas P., Strijp J. A., Weersink A. J., Verhoef J., van Kessel K. P. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1997, 61 (6), 721–8.
12. Prokopovych S. K., Vinnitzkiy S. K. Dendritic cells and prospects of their use in immunotherapy of cancer. *Oncology.* 2001, 3 (2–3), 126–131. (In Russian).
13. Sadahira Y., Mori M. Role of the macrophage in erythropoiesis. *Pathol. Int.* 1999, 49 (10), 841–848.
14. Van Handel B., Prasad S. L., Hassanzadeh-Kiabi N., Huang A., Magnusson M., Atanassova B., Chen A., Hamalainen E. I., Mikkola H. K. The first trimester human placenta is a site for terminal maturation of primitive erythroid cells. *Blood.* 2010, 116 (17), 3321–30.
15. Grisichenko V. I., Lobintseva G. S., Votyakova I. A., Shereshkov S. I. Fetal liver hematopoietic cells. *Kyiv: Naukova dumka*, 1988, 192 p. (In Russian).
16. Chena L., Gao Z., Zhua J., Rodgers G. P. Identification of CD13⁺CD36⁺ cells as a common progenitor for erythroid and myeloid lineages in human bone marrow. *Exp. Hematol.* 2007, 35 (7), 1047–1055.
17. Tepperman D., Curtis J. E., McCulloch E. A. Erythropoietic Colonies in Cultures of Human Marrow. *Blood.* 1974, 44 (5), 659–669.
18. Bárcena A., Kapidzic M., Muench M. O., Gormley M., Scott M. A., Weier J. F., Ferlatte C., Fisher S. J. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development. *Dev Biol.* 2009, 327(1), 24–33.
19. Serikov V., Hounshell C., Larkin S., Green W., Ikeda H., Walters M. C., Kuypers F. A. Human term placenta as a source of hematopoietic cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009, 234(7), 813–23. doi: 10.3181/0809-BC-262. Epub 2009 May 8.
20. Shablii V. A., Kuchma M. D., Kyryk V. M., Onishchenko A. N., Lukash L. L., Lobintseva G. S. Cryopreservation human placental tissue as source of hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Cellular transplantation and tissue engineering.* 2012, 7(1), 54–62. (In Russian).
21. Kuchma M., Shablii V., Kyryk V., Onishchenko A., Shablii Yu., Lukash L., Lobintseva G. Phenotypic heterogeneity of hematopoietic progenitor cells from placental tissue comparative analysis with umbilical cord blood and fetal liver. *Cell and organ transplantation.* 2013, 1(1), 66–69.

ВЫЯВЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛОСКИХ ЭРИТРОИДНЫХ КОЛОНИЙ В ПОЛУТВЕРДЫХ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ

М. Д. Кучма^{1, 2}
В. А. Шаблій^{1, 2}
В. М. Кирик³
А. Н. Свитина²
Ю. К. Прокопец²
Т. М. Индыченко²
О. М. Цупиков³
Л. Л. Лукаш¹
Г. С. Лобынцева²

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²ООО «Институт клеточной терапии», Киев,
Украина

³ГУ «Институт генетической и регенератив-
ной медицины НАМН», Киев, Украина

E-mail: kuchma@gmx.com

При культивировании ядродержащих клеток пуповинной крови, плаценты и «мобилизованной» периферической крови в полутвердых культуральных средах образуются плоские эритроидные колонии. На 14-е сут культивирования они могут формировать один или несколько красных агрегатов и достигать больших размеров, что свидетельствует об их высокой пролиферативной активности и сходстве с гранулоцитарными, эритроцитарными, моноцитарно/макрофагальными, мегакариоцитарными колониеобразующими единицами. Нами было установлено, что 92% клеток плоских колоний экспрессируют CD235, что указывает на принадлежность их к эритроидному клеточному ростку, хотя морфология колоний отличается от эритроидных бурстообразующих и эритроидных колониеобразующих единиц. Вероятность появления их в метилцеллюлозосодержащей среде составляет $2,5\% \pm 1\%$, что достоверно ниже, чем в агарсодержащей, — $58\% \pm 4,8\%$. Таким образом, при подсчете и классификации после культивирования в полутвердой культуральной среде плоские колонии следует либо выделять в отдельную группу, либо, ввиду низкой вероятности их появления в метилцеллюлозосодержащей среде, относить к эритроидным бурстообразующим единицам.

Ключевые слова: эритроидные колонии, колониеобразующая активность, пуповинная кровь, плацента, мобилизованная периферическая кровь.

DETECTION AND CHARACTERISTIC OF FLAT ERYTHROID COLONIES IN SEMISOLID CULTURAL MEDIA

M. D. Kuchma^{1, 2}
V. A. Shablii^{1, 2}
V. M. Kyryk³
A. N. Svitina²
Yu. K. Prokopets²
T. M. Indichenko²
O. M. Tsypikov³
L. L. Lukash¹
G. S. Lobyntseva²

¹Institute of Molecular Biology and Genetics
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

²Institute of Cellular Therapy, Kyiv, Ukraine

³Institute of Genetic and Regenerative Medicine
of the National Academy of Medical Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: kuchma@gmx.com

It have been shown that progenitor cells of cord blood, bone marrow and “mobilized” peripheral blood in semisolid media gave flat erythroid colonies. These colonies are able to form one or more red centers on the 14th day of cultivation and get a big size that evidence about high proliferative activity and resemble granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte colony-forming units. However 92% of the cells of flat colonies express CD235. It shows that the colonies are erythroid, although colony morphology differs from burstforming erythroid units and erythroid colony forming units. Their occurrence probability in methylcellulose-containing medium is $2,5\% \pm 1\%$, that is significantly lower than in agar-containing medium ($58\% \pm 4,8\%$). Thus, we suggested that flat colonies should be counted separately or they should be ascribed as BFU-E.

Key words: erythroid colonies, colonyforming activity, umbilical cord blood, placenta, mobilized peripheral blood.