



Новикова М.А.✉, Исайкина Я.И., Шман Т.В., Фролова Р.Л., Лях Е.Г., Савич Ю.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Влияние мезенхимальных стволовых клеток из различных частей плаценты на пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Новикова М.А. – дизайн исследования, экспансия CD34+–клеток в смешанной культуре, анализ колоние-образующей активности ГСК, анализ данных, написание статьи; Исайкина Я.И. – дизайн исследования, редактирование статьи; Шман Т.В. – иммунофенотипический анализ; Фролова Р.Л. – изоляция CD34+–клеток; Лях Е.Г. – получение и экспансия МСК; Савич Ю.В. – получение и экспансия МСК.

Подана: 20.07.2024
Принята: 10.09.2024
Контакты: mail@oncology.by

Резюме

Цель. Исследование влияния МСК из разных частей послеродовой плаценты на пролиферацию, дифференцировку и самоподдержание популяции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пуповинной крови (ПК) *in vitro*.

Материалы и методы. МСК были выделены из децидуальной ткани, ворсин хориона, амниотической мембраны плаценты и костного мозга (КМ). ГСК изолировали с использованием конъюгированных с магнитными частицами антител к маркеру CD34. Селектированные CD34+–клетки культивировали в среде, содержащей ростовые факторы на фидерном слое МСК. Подсчет количества ядросодержащих клеток (ЯСК) и иммунофенотипический анализ ГСК проводили на 0-е и 7-е сутки на проточном цитометре. Пролиферативную активность ГСК оценивали по колониеобразующей способности клеток-предшественников гемопоэза в среде метилцеллюлозы.

Результаты. При культивировании ГСК на фидерном слое МСК из децидуальной ткани плаценты наблюдались достоверный прирост ЯСК и CD34+–клеток ($p < 0,05$), а также сохранение популяции CD34+CD3– клеток. МСК из децидуальной ткани послеродовой плаценты способствовали ранней дифференцировке ГСК, что выражалось в приросте ранних предшественников лимфопоэза и миелопоэза ($p < 0,05$). Анализ колоний показал, что ГСК ПК после культивирования как с МСК из разных частей плаценты, так и с МСК-КМ не отличались по способности к колониеобразованию, и во всех случаях наблюдался прирост колониеобразующей единицы (КОЕ) в среднем в 1,8 раза по сравнению с 0-м днем ($p < 0,05$), тогда как при отсутствии МСК число КОЕ увеличилось лишь в 1,1 раза.

Заключение. Применение МСК из разных частей плаценты для *in vitro* экспансии ГСК пуповинной крови позволяет увеличить число бипотентных и сохранить уровень ранних мультипотентных клеток-предшественников гемопоэза.



Ключевые слова: мезенхимальная стволовая клетка, послеродовая плацента, пуповинная кровь, костный мозг, предшественник гемопоэза, колониеобразующая единица

Novikova M., Isaikina Ya., Shman T., Fralova R., Liakh E., Savich Yu.
The Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

The Effect of Mesenchymal Stem Cells from Different Parts of Placenta on the Proliferation and Differentiation of Umbilical Cord Hematopoietic Stem Cells

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Novikova M. – the concept and design of research, expansion of CD34+ cells in mixed culture, analysis of colony-forming activity of HSCs, data analysis, writing article; Isaikina Ya. – the concept and design of research, editing text; Shman T. – immunophenotypic analysis; Fralova R. – isolation of CD34+ cells; Liakh E. – MSCs expansion; Savich Yu. – MSCs expansion.

Submitted: 20.07.2024

Accepted: 10.09.2024

Contacts: mail@oncology.by

Abstract

Purpose. The study of the influence of MSCs from different parts of placenta at the proliferation, differentiation and self-renewal of the umbilical cord blood hematopoietic stem cells (HSCs) population in vitro.

Materials and methods. MSCs were isolated from decidual tissue, chorionic villi, and amniotic membrane of the placenta and bone marrow (BM). HSCs were isolated using antibodies to the CD34 marker conjugated to magnetic particles and then were cultured in the medium containing growth factors on the MSCs feeder layer. The nucleated cells counting and immunophenotypic analysis performed on days 0 and 7 using a flow cytometer. The proliferative activity of HSCs assessed by the colony-forming ability in a methylcellulose medium.

Results. A significant increase in TNCs and CD34+ cells on the feeder layer of MSCs from the decidual tissue of the placenta was shown ($p < 0.05$), as well as preservation of the population of CD34+CD38- cells. MSCs derived from the decidual tissue promoted early differentiation of HSCs and the growth of early precursors of lymphopoiesis and myelopoiesis ($p < 0.05$). Analysis of the colony forming capacity didn't show the different between the cultivation HSCs on MSCs from various parts of the placenta and from BM, and the numbers of colony-forming units (CFUs) increased 1.8 times compared to 0 day ($p < 0.05$), whereas in the absence of MSCs the number of CFU increased only 1.1 times.

Conclusion. The use of MSCs from different parts of the placenta for in vitro expansion of umbilical cord blood HSCs allows increasing the number of bipotent hematopoiesis precursors and support the level of early multipotent hematopoietic precursor cells.

Keywords: mesenchymal stem cell, placenta, umbilical cord blood, bone marrow, hematopoietic precursor, colony-forming unit

■ ВВЕДЕНИЕ

В течение последних 20 лет пуповинная кровь (ПК) стала альтернативным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для проведения аутологичной и аллогенной трансплантации. ГСК, полученные из ПК, имеют ряд преимуществ, таких как высокое содержание мультипотентных предшественников гемопоэза; более длинные участки теломер, что обуславливает увеличение пролиферативного потенциала; аутокринная продукция ростовых факторов [1]. Однако небольшой объем и, соответственно, ограниченное количество ГСК, получаемых от одной единицы ПК, остается недостаточным для полного восстановления гемопоэза костного мозга (КМ) у взрослого пациента [2, 3]. Таким образом, необходимы новые стратегии увеличения содержания общего количества ядросодержащих клеток (ЯСК), и в частности CD34+ -клеток, что повысит вероятность успешного приживления трансплантата. Одной из таких стратегий в настоящее время является совместное культивирование ГСК с мезенхимальными стромальными клетками (МСК) в присутствии цитокинового коктейля.

В настоящий момент идентифицировано более 30 факторов, включенных в процесс гемопоэза на различных его этапах, наиболее значимые из которых выделяют эритропоэтин (erythropoietin – EPO), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – GM-CSF), фактор стволовых клеток (stem cell factor – SCF), тромбопоэтин (thrombopoietin – TPO), FMS-подобная тирозинкиназа 3 лиганд (the Feline McDonough sarcoma-like tyrosine kinase 3 ligand – FLT-3l), фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor – Fgf), интерлейкин – 3, 6, 11 (interleukin – IL-3, IL-6, IL-11) [4, 5]. SCF влияет не только на пролиферацию ранних предшественников стволовых клеток миелоидного, лимфоидного, эритроидного и мегакариоцитарного ряда, но и в значительной степени потенцирует действие других ростовых факторов. TPO в сочетании с FLT-3l усиливает клоногенную активность ГСК. В литературе встречаются различные комбинации ростовых факторов, применяемых для экспансии CD34+ -клеток в жидких бессывороточных средах. В исследованиях *in vitro* было показано оптимальное сочетание ростовых факторов для обеспечения экспансии наибольшего количества CD34+ -клеток, включающее SCF, TPO, FLT-3l, IL-6 в различных концентрациях [6].

Существует большое количество исследований применения МСК КМ в качестве фидерного слоя для имитации нишевой микросреды, обеспечивающей самовозобновление и пролиферацию ГСК, а также ингибирование апоптоза и дифференцировки клеток всех линий кроветворения [4, 5, 7, 8].

Во время внутриутробного развития плацента частично поддерживает кроветворение, и можно предположить, что МСК, полученные из различных частей плацентарного комплекса, способны поддерживать экспансию CD34+ -клеток при совместном культивировании [9, 10].

Анализ способности стволовых клеток и клеток-предшественников к пролиферации и самовоспроизведению дает представление о функциональной активности ГСК



[5, 11]. При этом из плюрипотентных стволовых клеток формируются более дифференцированные колониеобразующие единицы (КОЕ), наиболее ранние из которых гранулоцитарно-эритроцитарно-моноцитарно-макрофагальные (КОЕ-ГЭММ), которые в свою очередь дают начало более зрелым типам КОЕ: колониеобразующая единица гранулоцитов и моноцитов (КОЕ-ГМ), бурст-образующая единица эритроцитов (БОЕ-Э) и колониеобразующая единица мегакариоцитов (КОЕ-МГЦ) [12, 13].

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

КМ-МСК получали путем выделения мононуклеарной фракции из аспирата КМ здоровых доноров. Мононуклеарные клетки выделяли на градиенте плотности 1,077 (Sigma, США), дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере, ресуспендировали в среде IMDM с 10% (ЭТЦ) и переносили в концентрации 3×10^6 /мл во флаконы. Культивирование проводили при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Через 48 ч. проводили смену среды. При достижении 70–90% конфлюэнтного слоя клетки снимали с поверхности флакона 0,25%-ным раствором трипсин-ЭДТА и рассаживали в новые флаконы по 1×10^6 . П-МСК получали путем восстановления депонированных в криобанке культур МСК. П-МСК и КМ-МСК культивировали с проведением 10 и 6 пассажей соответственно.

Иммунофенотипический анализ клеток культуры П-МСК и КМ-МСК 4-го и 6-го пассажей проводили на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson, США), используя набор моноклональных антител (MSC Phenotyping Kithuman, MiltenyiBiotec GmbH, Германия) для определения CD105, CD90, CD73, CD34, CD14, CD20, CD45 и Anti-HLA-DR, меченные FITC, PE, PC7, и изотипический контроль, входящий в набор и программу CELLQuest Software. В каждом образце анализировали не менее 10 000 клеток.

Изоляцию МНК и CD34+-клеток ПК и КМ проводили путем выделения мононуклеарной фракции ПК и КМ на градиенте плотности Гистопак 1,077 г/мл (Sigma, США) с последующей двукратной отмывкой в фосфатно-солевом буфере. CD34+-клетки изолировали с использованием конъюгированных с магнитными частицами антител к поверхностному маркеру CD34 (Life Technologies, США) согласно протоколу производителя. Процент селектированных CD34+-клеток оценивали иммунофенотипическим методом.

Экспансию МНК и селектированных CD34+-клеток проводили в смешанной культуре на подложке МСК. МНК в количестве 1×10^6 или CD34+ в количестве 5×10^4 клеток на лунку помещали в 24-луночный планшет, содержащий предварительно облученный (доза 30 Гр) фидерный слой П-МСК и КМ-МСК в соотношении 1 : 2. В качестве контроля использовали МНК и CD34+-клетки, помещенные в лунки без МСК. Культивирование проводили в среде RPMI (Life Technologies, США), содержащей 15%-ную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТЦ) (Life Technologies, США) и ростовые факторы: SCF 60 нг/мл, TPO 60 нг/мл, FLT-3l 60 нг/мл, IL-6 10 нг/мл в течение 7 суток. После чего оценивали количество, жизнеспособность и содержание CD34+-клеток.

Иммунофенотипический анализ ГСК проводили на 0-е и 7-е сутки после экспансии на проточном цитометре Dx Flex (Beckman Coulter, США), используя моноклональные антитела CD38FITC/CD123PE/CD34PC7/CD10PC55/CD45APC750 (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 10 000 клеток.

Оценку колониообразующей способности ГСК до и после экспансии в образцах ПК проводили путем культивирования 1×10^5 клеток в среде метилцеллюлозы (StemCell Technologies, Канада) в течение 14 сут. при температуре 37 °C, 5%-ном CO₂ и 90%-ной влажности с подсчетом количества КОЕ-ГЭММ, БОЕ-Э, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г и КОЕ-М. Количество КОЕ подсчитывали под инвертированным микроскопом AXIOVERT (Zeiss, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с применением программы Statistica 7.0. Использовали методы описательной статистики и непараметрические методы – t-критерий Вилкоксона и метод Краскела – Уоллиса. Достоверность различий между сравниваемыми показателями считали статистически значимой при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культуры МСК были выделены из децидуальной ткани, ворсин хориона, амниона послеродовой плаценты 7 доноров и КМ 4 здоровых доноров. Для анализа использовали МСК 4-го и 6-го пассажей. В полученных культурах МСК КМ и плаценты присутствовало 94–99% клеток, положительных по маркерам CD90, CD73, CD105, и менее 2% клеток, несущих маркеры гемопоэтических клеток CD45+/CD14+/CD34+, а также менее 1,1% клеток, положительных по маркеру главного комплекса гистосовместимости 2-го класса – HLA-DR. Весь наработанный клеточный материал МСК заморожен с добавлением криопротектора 10%-ного ДМСО и 5%-ного альбумина и депонирован в криобанке культур МСК при –196 °C. Перед проведением эксперимента образцы МСК размораживали на водяной бане при температуре 37 °C, отмывали от криопротектора и восстанавливали в культуре в течение 3–5 дней.

Гемопоэтические CD34+-клетки получали из КМ здоровых доноров ($n=11$) объемом $15 \pm 4,66$ мл и пуповинной крови ($n=5$) объемом $11,5 \pm 2,5$ мл. Из мононуклеарной фракции в количестве $73,75 \pm 29,28 \times 10^6$ клеток, выделенной на градиенте плотности, изолировали CD34-положительные клетки методом иммуномагнитной селекции. Количество выделенных клеток в среднем составляло $1,17 \pm 0,67 \times 10^6$. Полученная фракция клеток сохраняла высокую жизнеспособность на уровне 99%. После селекции в образцах отсепарированных клеток были оценены поверхностные маркеры предшественников гемопоэза с помощью иммунофенотипического метода. Одним из признаков стволовости и ранних предшественников гемопоэтических клеток является экспрессия поверхностного маркера CD34+. В КМ содержание таких клеток достигает 1–4%, в то время как в ПК их содержание около 1% от всей фракции мононуклеарных клеток [14, 17]. Нами не выявлено достоверных различий в процентном содержании CD34+-положительных клеток во фракции клеток, изолированных из ПК и КМ (см. таблицу).

Экспансию CD34+-клеток в смешанной культуре МСК из разных частей плаценты и КМ проводили в течение 7 суток, поскольку длительное культивирование в присутствии цитокинового коктейля способствует линейной дифференцировке клеток-предшественников гемопоэза, в то время как кратковременное культивирование характеризуется сохранением пула ранних длительно репопулирующих КМ стволовых клеток, хотя и имеет более низкий показатель прироста ГСК [11]. В ходе сокультивирования ГСК и МСК из различных источников было отмечено, что часть CD34+-клеток оставалась в суспензии, часть образовывала кластеры и часть прикреплялась к фидерному слою (рис. 1).



Иммунофенотипическая характеристика селектированных CD34+-клеток КМ и ПК (%)
Immunophenotypic characteristics of selected CD34+ cells derived from BM and CB (%)

Поверхностный маркер	Содержание, %		Достоверность различий
	КМ	ПК	
CD34+	76,35±13,47	77±6	p>0,05
CD34+CD38-	20,43±7,6	48,22±11,82	p<0,05
CD34+CD38+	83,42±6,56	51,98±11,58	p<0,05
CD34+CD10+	38,56±17,46	1,3±0,63	p<0,05
CD34+CD10-	64,74±14,78	98,67±0,63	p<0,05
	n=11	n=5	

Способность МСК, полученных из разных частей плаценты, поддерживать пролиферацию ГСК оценивали по кратности прироста ЯСК и CD34+-клеток на 7-е сутки культивирования в смешанной культуре на подложке МСК с добавлением ростовых факторов по сравнению с контролем при отсутствии МСК.

Нами было показано достоверное увеличение прироста ЯСК (p=0,027) (рис. 2) и CD34+-клеток (p=0,027) (рис. 3) на фидерном слое МСК, выделенных из децидуальной ткани плаценты. Схожие результаты для МСК из децидуальной ткани плаценты были получены в исследовании Abomarray et al. [10].

Гликопротеин CD38 является поверхностным маркером пролиферирующих и созревающих клеток. Таким образом, истинно стволовыми клетками можно считать

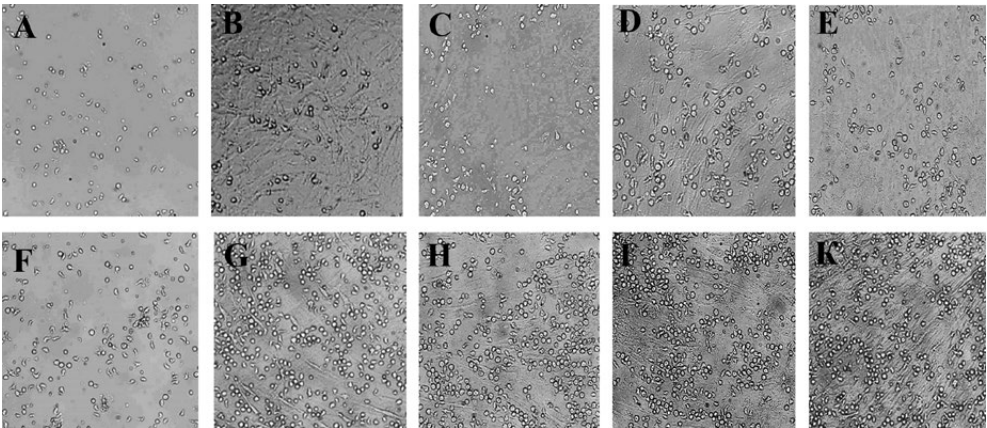


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия смешанной культуры, день 0: А – CD34+-клетки в отсутствие фидерного слоя МСК, В, С, D, Е – CD34+-клетки в присутствии МСК из децидуальной ткани, хориона, амниотической мембраны, КМ; фазово-контрастная микроскопия смешанной культуры, день 7: F – CD34+-клетки при отсутствии фидерного слоя МСК, G, H, I, K – CD34+-клетки в присутствии МСК из децидуальной ткани, хориона, амниотической мембраны, КМ
Fig. 2. Phase-contrast microscopy of a mixed culture, day 0: А – CD34+ cells in the absence of the MSC feeder layer, B, C, D, E – CD34+ cells in the presence of MSCs from decidual tissue, chorion, amniotic membrane, bone marrow; phase-contrast microscopy of mixed culture day 7: F – CD34+ cells in the absence of the MSC feeder layer, G, H, I, K – CD34+ cells in the presence of MSCs from decidual tissue, chorion, amniotic membrane, bone marrow

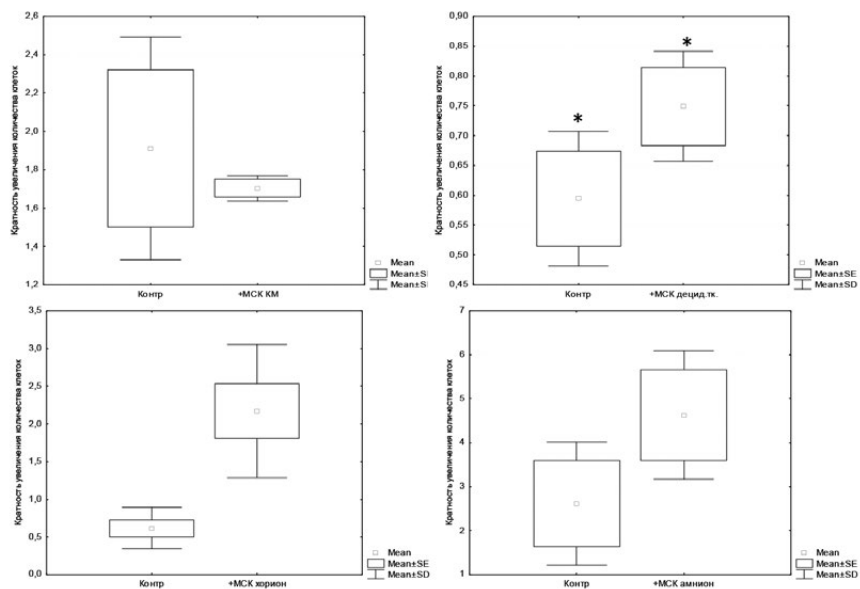


Рис. 2. Кратность увеличения ЯСК в условиях сокультивирования с МСК из разных частей плаценты и КМ
Fig. 2. The fold increase in TNCs in co-culture with MSCs derived from different parts of the placenta and bone marrow

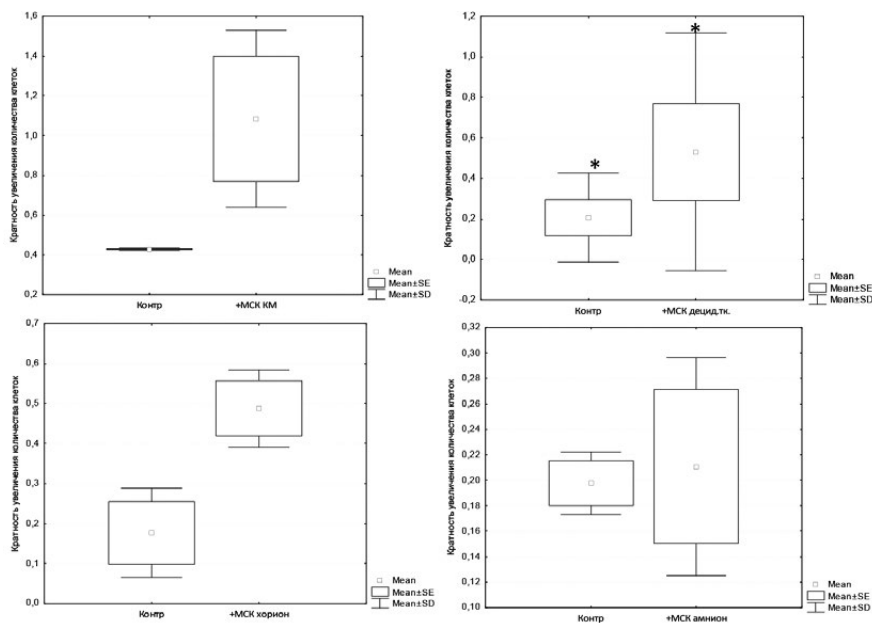


Рис. 3. Кратность увеличения CD34+ в условиях сокультивирования с МСК из разных частей плаценты и КМ
Fig. 3. The fold increase of CD34+ cells in co-culture with MSCs derived from different parts of the placenta and bone marrow

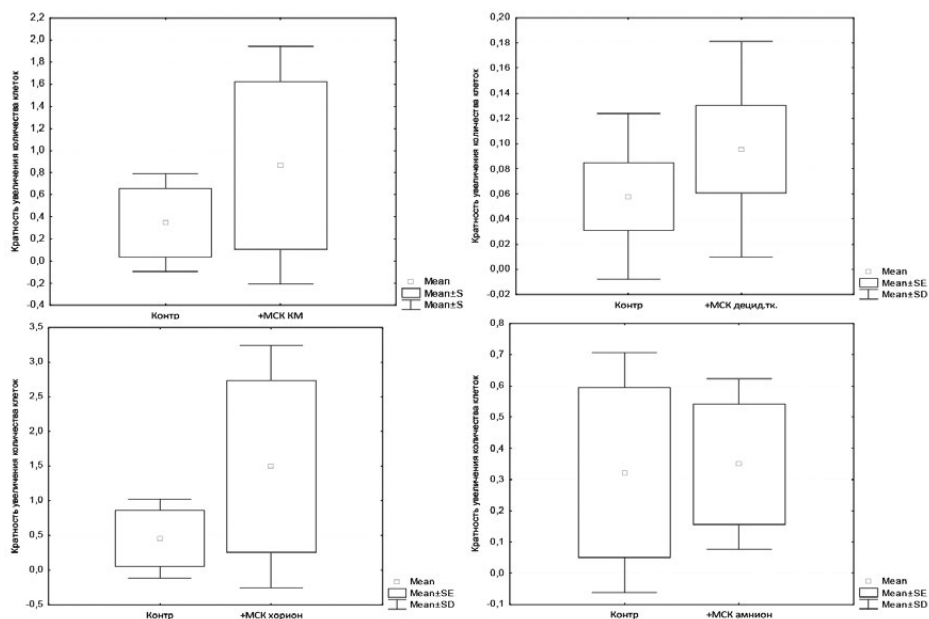


Рис. 4. Кратность увеличения CD34+CD38– клеток в условиях сокультивирования с МСК из разных частей плаценты и КМ

Fig. 4. The fold increase of CD34+CD38– cells in co-culture with MSCs derived from different parts of the placenta and bone marrow

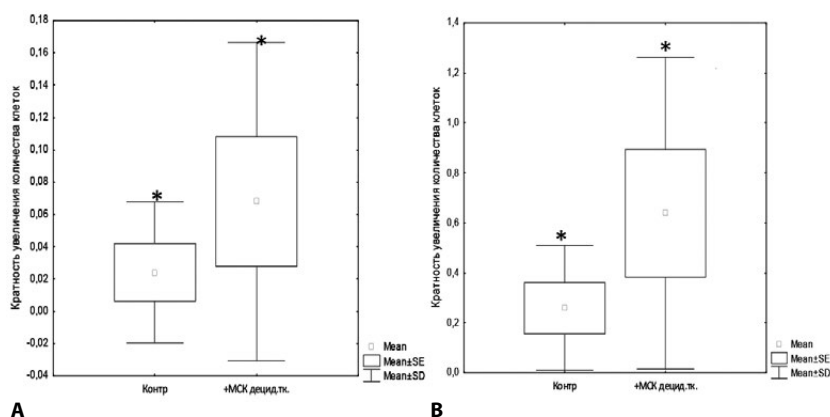


Рис. 5. Кратность увеличения CD34+CD10+ клеток (А) и CD34+CD10– клеток (В) в условиях сокультивирования с МСК из децидуальной ткани плаценты

Fig. 5. The fold increase of CD34+ CD10+ cells (A) and CD34+ CD10– cells (B) in co-culture with MSCs derived from decidua tissue of placenta

популяцию с фенотипом CD34+CD38–, которая в процессе пролиферации начинает экспрессировать CD38 и приобретает фенотип CD34+CD38+, характерный для ранних предшественников линейной дифференцировки [11, 13]. Доля клеток с фенотипом CD34+CD38– от фракции всех селектированных CD34+–клеток, изолированных

из пуповинной крови, была достоверно выше, чем из КМ ($p=0,00005$). При оценке способности ГСК к самовоспроизведению и сохранению мультипотентности после экспансии было показано сохранение популяции CD34+CD38– клеток (рис. 4).

Orticelli et al. и Bucar et al. показали, что МСК из амниотической мембраны способны поддерживать пролиферацию наиболее ранних предшественников кроветворения [4, 5]. В то же время Kadecar et al. выявили способность самоподдержания ГСК пуповинной крови как МСК плаценты, так и МСК пупочного канатика [12, 13].

Также была проведена оценка экспрессии раннего лимфоидного антигена CD10 на поверхности CD34+–клеток. Количество клеток, несущих CD10-антиген, было достоверно выше в популяции CD34+–клеток, выделенных из КМ, по сравнению с пуповинной кровью ($p=0,012$). В то время как популяция клеток с фенотипом CD34+CD10– была значительно больше в изолированной из пуповинной крови фракции, чем в КМ ($p=0,022$). МСК, полученные из децидуальной ткани послеродовой плаценты, способствуют ранней дифференцировке ГСК, что выражается в приросте ранних предшественников лимфопоэза CD34+CD10+ ($p=0,0277$) и миелопоэза CD34+CD10– ($p=0,0277$) (рис. 5).

Способность ГСК образовывать колонии миелоидного роста в полужидкой среде метилцеллюлозы является достоверным показателем их пролиферативного и дифференцировочного потенциала и, соответственно, способности восстанавливать гемопоэз после трансплантации. При фазово-контрастной микроскопии колониеобразующего теста экспансированных ГСК ПК после депонирования состав КОЕ включал в себя все типы колоний: КОЕ-ГЭММ, БОЕ-Э, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-ГМ. Анализ колоний показал, что ГСК ПК после 7 суток культивирования как с МСК из разных частей плаценты, так и с МСК-КМ не отличались по способности к колониеобразованию, и во всех вариантах наблюдался прирост КОЕ в среднем в 1,8 раза по сравнению с 0-м днем ($p<0,05$), тогда как при отсутствии МСК число КОЕ увеличилось лишь в 1,1 раза (рис. 6). Прирост количества КОЕ после экспансии на фидерном слое МСК наблюдали также Meyer et al. [2].

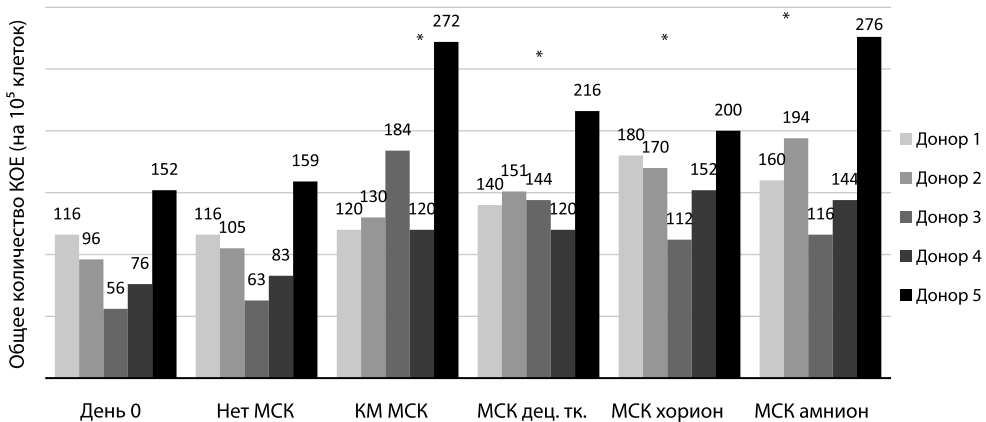


Рис. 6. Общее количество КОЕ на 0-е и 7-е сутки экспансии ГСК ПК после депонирования в присутствии МСК из разных источников
Fig. 6. Total number of CFU on days 0 and 7 after expansion of UCB HSCs after deposition in the presence of MSCs from different sources

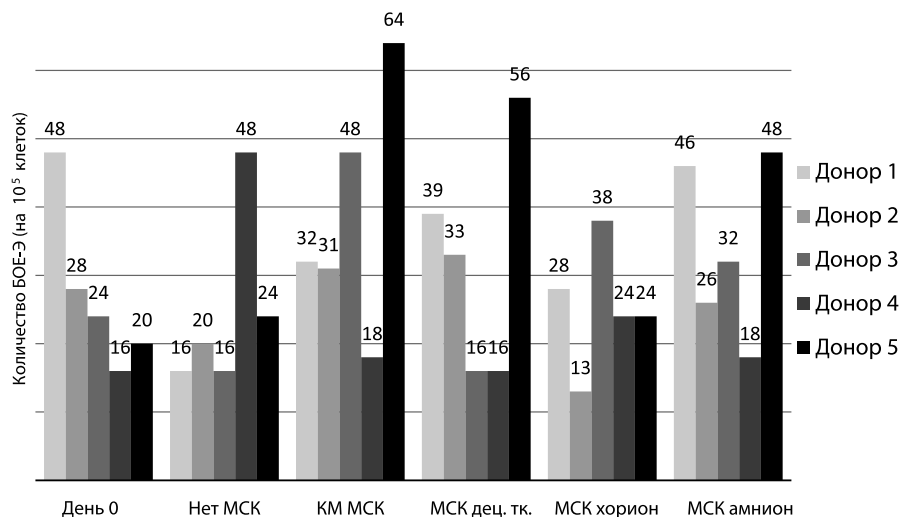


Рис. 7. Количество БОЕ-Э на 0-е и 7-е сутки экспансии ГСК ПК после депонирования в присутствии МСК из разных источников
Fig. 7. The number of BFU-E on days 0 and 7 after the expansion of UCB HSCs from after deposition in the presence of MSCs derived from different sources

Оценка пролиферативной активности бипотентных предшественников гемопоэза показала достоверное увеличение количества КОЕ-ГМ после экспансии на фидерном слое МСК из всех источников: с МСК из децидуальной ткани – в 4 раза, ворсин хориона – в 2,75 раза, амниотической мембраны – в 4,5 раза, МСК-КМ – в 2,25 раза

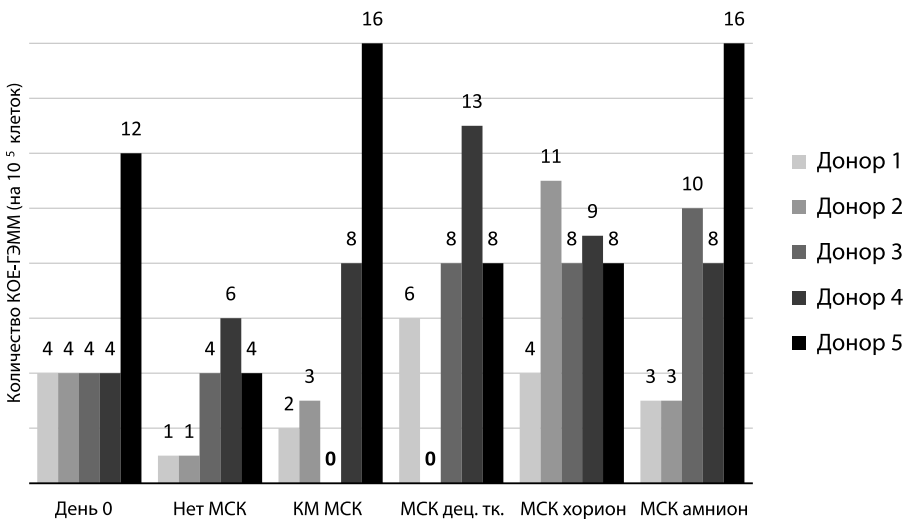


Рис. 8. Количество КОЕ-ГЭММ на 0-е и 7-е сутки после экспансии ГСК ПК после депонирования в присутствии МСК из разных источников
Fig. 8. The number of CFU-GEMM on days 0 and 7 after the expansion of UCB HSCs from after deposition in the presence of MSCs derived from different sources

($p<0,05$). Важно отметить, что и МСК-КМ, и МСК плаценты способствовали поддержанию популяции предшественников эритропоэза: число БОЕ-Э до экспансии составляло 27 (16–48), а после культивирования с МСК-КМ – 24 (10–84) и МСК плаценты – 17 (2–56) (рис. 7).

Кроме того, наблюдалось сохранение уровня ранних мультипотентных предшественников миелопоэза, число КОЕ-ГЭММ до экспансии составляло 6 (4–12), а после культивирования с МСК-КМ – 8 (0–16) и МСК плаценты – 5 (0–16) (рис. 8).

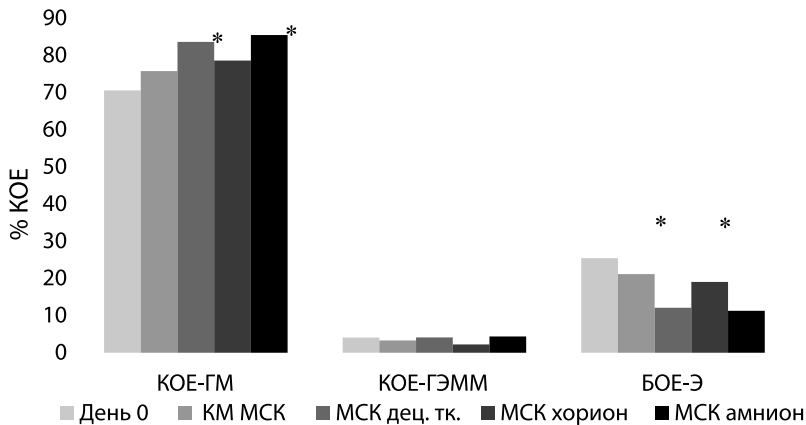


Рис. 9. Соотношение типов колоний на 0-е и 7-е сутки после экспансии ГСК ПК после депонирования в присутствии МСК из разных источников
Fig. 9. The ratio of colony types on days 0 and 7 after expansion of UCB HSCs after deposition in the presence of MSCs from different sources

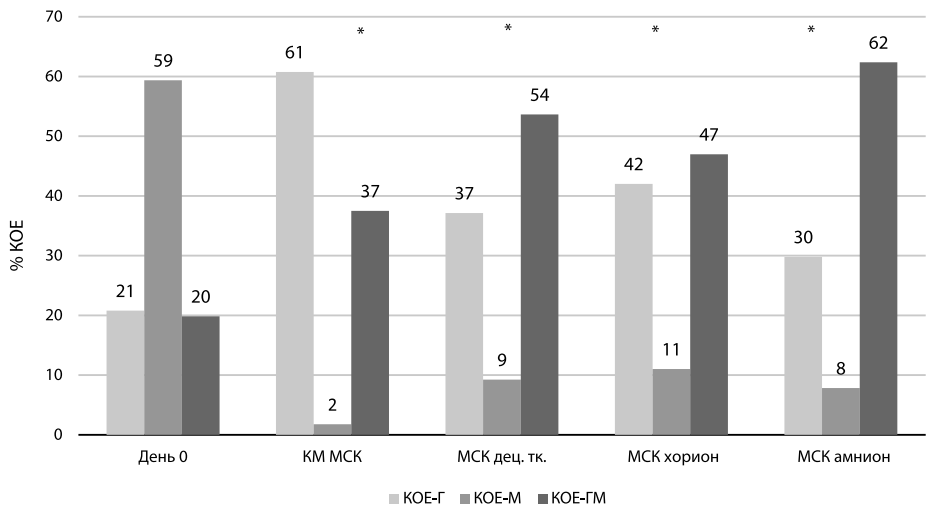


Рис. 10. Соотношение КОЕ бипотентных и унипотентных клеток-предшественников миелопоэза после экспансии ГСК на фидерном слое МСК из разных источников
Fig. 10. The ratio of CFU of bipotent and unipotent myelopoiesis precursor cells after expansion of HSCs on the MSCs feeder layer derived from different sources



Melania et al., Lin et al. и Li et al. также показали прирост уровня ранних предшественников миелопоэза, однако в качестве фидерного слоя они использовали МСК, полученные из вартонова студня [7, 15, 16].

Также мы наблюдали изменение соотношения типов колоний, процентное содержание которых на 0-й день имело следующий вид: КОЕ-ГМ – 71%, КОЕ-ГЭММ – 4%, БОЕ-Э – 25%. На 7-е сутки культивирования с МСК из децидуальной ткани содержание БОЕ-Э снизилось до 12%, а при культивировании с МСК из амниотической мембраны – до 11% ($p < 0,05$). При этом было отмечено соответствующее увеличение процентного содержания КОЕ-ГМ ($p < 0,05$) (рис. 9).

При анализе количества коммитированных клеток-предшественников было показано, что для неэкспандированных клеток доля бипотентных миелоидных колоний КОЕ-ГМ составляла 20%, в то время как оставшиеся 80% были унипотентными (КОЕ-Г и КОЕ-М). После 7 суток экспансии ГСК на фидерном слое МСК из децидуальной ткани, хориона, амниотической мембраны плаценты и КМ мы наблюдали изменение соотношения бипотентных и унипотентных предшественников миелопоэза ($p < 0,05$) (рис. 10).

■ ВЫВОДЫ

1. МСК, полученные из децидуальной ткани послеродовой плаценты, поддерживают пролиферацию ЯСК и CD34+–клеток *in vitro*, прирост которых достоверно выше, чем в контроле.
2. МСК, полученные из децидуальной ткани послеродовой плаценты, способствуют ранней дифференцировке ГСК, что выражается в более высоком уровне прироста ранних предшественников лимфопоэза CD34+10+ и миелопоэза CD34+10– по сравнению с контролем.
3. Установлено, что экспансия CD34+–клеток на фидерном слое МСК плаценты в присутствии ростовых факторов способствует сохранению субпопуляции ранних предшественников гемопоэза CD34+CD38–.
4. Применение МСК из разных частей плаценты и КМ для экспансии ГСК *in vitro* в образцах депонированной при сверхнизкой температуре пуповинной крови позволяет увеличить число клеток-предшественников гемопоэза, а также сохранить уровень ранних мультипотентных КОЕ-ГЭММ.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Anand S., Thomas S., Corbet K., et al. Adult umbilical cord blood transplantation using myeloablative thiotepa, total body irradiation, and fludarabine conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23:1949–1954.
2. Meyer T.P. et al. Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Cytotherapy.* 2006;8(3): 265–276.
3. Fry L.J., Querol S., Gomez S.G., et al. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang.* 2015;109:181–90.
4. Ortice V., Papait A., Vertua E., et al. Human amniotic mesenchymal stromal cells support the ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *STEM CELLS Transl Med.* pp. 1–14.
5. Bucar S., Dargen de Matos Branco A., F. Mata M. et al. Influence of the mesenchymal stromal cell source on the hematopoietic supportive capacity of umbilical cord blood-derived CD34+–enriched cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 2021;12:399.
6. Branco A., Bucar S., Moura-Sampaio J. et al. Tailored Cytokine Optimization for ex vivo Culture Platforms Targeting the Expansion of Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:e.573282. doi: 10.3389/fbioe.2020.573282
7. Melania Lo Iacono, Eleonora Russo, Rita Anzalone. Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells Support the Expansion of Cord Blood-derived CD34+ Cells Mimicking a Hematopoietic Niche in a Direct Cell – cell Contact Culture System. *Cell Transplantation*, 2018;27(1):117–129.

8. Noa Sher and Racheli Ofir. Placenta-Derived Adherent Stromal Cell Therapy for Hematopoietic Disorders: A Case Study of PLX-R18 *Cell Transplantation*, 2018;27(1):140–150.
9. Miceli V., Chinnici C.M., Bulati M. et al. Comparative study of the production of soluble factors in human placenta-derived mesenchymal stromal/stem cells grown in adherent conditions or as aggregates in a catheter-like device. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.069>
10. Abomaray F.M., Al Jumah M.A., Alsaad K.O. et al. Phenotypic and functional characterization of mesenchymal stem/multipotent stromal cells from Decidua Basalis of human term placenta *Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International*. 2016;2016. Article ID 5184601, 18 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5184601>
11. Xie H., Sun L., Zhang L. et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles support ex vivo expansion of cord blood-derived CD34+ cells. *Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International*. 2016;2016. Article ID 6493241, 13 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6493241>
12. Kadekar D., Rangole S., Kale V., et al. Conditioned medium from placental mesenchymal stem cells reduces oxidative stress during the cryopreservation of ex vivo expanded umbilical cord blood cells. *PLoS ONE*. 2016;11(10):e0165466. doi:10.1371/journal.pone.0165466
13. Kadekar D., Kale V., Limaye L. Differential ability of MSCs isolated from placenta and cord as feeders for supporting ex vivo expansion of umbilical cord blood derived CD34+ cells. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:201. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0194-y>
14. Sumide K., Matsuoka Y., Kawamura H., et al. A revised road map for the commitment of human cord blood CD34-negative hematopoietic stem cells. *Nat Commun*. 2018;9(1):202. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04441-z>
15. Lin H.D., Fong Ch., Biswas A. et al. Allogeneic human umbilical cord Wharton's jelly stem cells increase several-fold the expansion of human cord blood CD34+ cells both in vitro and in vivo *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11:527. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02048-0>
16. Li Qi, Zhao D., Chen Qi et al. Wharton's jelly mesenchymal stem cellbased or umbilical vein endothelial cellbased serum-free coculture with cytokines supports the ex vivo expansion/ maintenance of cord blood hematopoietic stem/progenitor cells *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10:376. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1502-8>
17. Eleuteri S., Fierabracci A. Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *Int. J. Mol. Sci*, 2019;20:4597.