

**СЕПАРАЦИЯ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ФЕНОТИПИРОВАНИЕ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ**

(Научно-производственное предприятие «Антиген»)

*В статье приводятся данные по определению оптимальных условий сепарации и культивированию стволовых клеток пуповинной крови. Приведены данные по экспансии гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови при культивировании in vitro.*

Пуповинная кровь (ПК) - ценный источник стволовых клеток. Кровь эта содержит немало стволовых клеток, в основном кроветворных "предшественников". Областью применения стволовых клеток ПК в медицине является в основном гематология (лечение разных форм лейкозов), наиболее широкая, по сравнению с другими областями медицины. Лидерами по количеству ежегодных трансплантаций ПК являются Япония, и США, где половина трансплантаций у детей приходится на ПК, а у взрослых пациентов этот показатель достигает 20% [1].

По данным ряда авторов, в период с 1993 по 2007 год было выполнено 8000-9000 трансплантаций ПК [2]. Общее количество замороженных образцов составляет 350-400 тысяч в 35 банках 21 страны [3]. Их количество с каждым годом растет, это связано со следующими факторами:

- отсутствие этических проблем применения ПК в клинической практике;
- простая процедура забора ПК, не наносящая вред новорожденному;
- преимущества неродственной трансплантации клеток ПК по сравнению с клетками костного мозга;
- доступность образцов ПК.

Вместе с тем, принципиальным недостатком пуповинной крови можно считать, прежде всего, малое количество стволовых клеток, получаемых при единичной заготовке [4]. Потери клеточной массы в процессе сепарации, криоконсервирования, размораживания и тестирования для пуповинной крови такие потери клеток могут приводить к возникновению несостоятельности трансплантата и рецидива основного заболевания при пересадках. Решением данной проблемы может быть оптимизация методов сепарации и культивирование стволовых клеток пуповинной крови in vitro.

Целью данной работы является определение оптимальных условий сепарации и увеличение содержания стволовых клеток посредством предварительного культивирования in vitro.

**Материалы и методы**

Образцы пуповинной крови были получены от пациенток Научного центра гинекологии, акушерства и перинатологии после срочных родов. Объем полученной пуповинной крови в среднем варьировал от 20 до 110 см<sup>3</sup>. Срок от момента забора ПК до ее обработки составил 5-8 часов.

Сепарацию ПК проводили четырьмя методами:

1. сепарация ПК с раствором полиглюкина в разведении 1:1;
2. разделение клеток ПК в градиенте фикола ( $\rho = 1,077$ );
3. сепарация ПК с 3% раствором желатина;
4. обработка ПК лизирующим раствором хлористого аммония в течение 10-15 мин.

Количественный учет ядродержащих (ЯСК) и мононуклеарных клеток (МНК) в пуповинной крови до и после обработки проводили на автоматическом гемацитометре. Определение процентного содержания гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), меченных по CD 34, CD 38+ и CD 45+ проводили на проточном цитофлуометре BD. Количественный учет и фенотипирование стволовых клеток ПК проводили совместно с сотрудниками лаборатории «Цитологии» Научного центра гинекологии, акушерства и перинатологии РК (зав. лаб. д.б.н. профессор В.С. Толмачев, СИС, к.б.н. Кудрина Н.О.): Всем им выражаю свою сердечную благодарность за помощь в работе.

Культивирование стволовых клеток ПК проводили в культуральных флаконах T-25 Canted Neck, IWAKI. Для культивирования клеток ПК использовали среды Игла MEM альфа с 20% плазмы ПК (ППК) или среды mesencult (StemCell Technologies Inc). Клетки инкубировали при температуре 37<sup>0</sup>С в СО<sub>2</sub>-инкубаторе. В качестве ингибитора дифференцировки стволовых клеток ПК использовали лейкемию ингибирующий фактор (Ли-фактор) в концентрации 500 ед/см<sup>3</sup>. Для культивирования клеток ПК использовали основном аутологичную плазму за исключением тех случаев, когда заготавливали малый объем ПК. В этих случаях использовали аллогенную плазму ПК. Для получения цитологических препаратов монослой клеток фиксировали метанолом и окрашивали по Гимза.

## Результаты и их обсуждение

Количественный учет ЯСК и МНК пуповинной крови проводили до и после сепарации. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1 наиболее оптимальным методом сепарации пуповинной крови является разделение в градиенте фикола. В этом случае наблюдается наибольший процент выхода ядросодержащих и моноклеарных клеток. Сепарация ПК с полиглобулином приводит к значительной потере клеток. Сепарация с 3% раствором желатина дает сходный результат с градиентом фикола, но в этом случае не происходит полной очистки суспензии от эритроцитов, которые препятствуют культивированию клеток ПК. Обработка лизирующим раствором приводит к полной очистке суспензии от эритроцитов, но повреждает мембраны клеток, что уменьшает адгезию клеток на подложку.

**Таблица 1** - Определение количества ЯСК и МНК в суспензии клеток пуповинной крови до и после сепарации

Основные параметры	ЯСК в образце $\times 10^6 / \text{см}^3$	Общий выход ЯСК $\times 10^8$ клеток	Процент выхода %	МНК в образце $\times 10^6 / \text{см}^3$	Общий выход МНК $\times 10^8$ клеток	Процент выхода %
До сепарации	16,5±0,2	11,55±0,2	100	7,4±0,1	5,18±0,1	100
Сепарация с 3% раствором желатина	7,8±0,1	5,4±0,1	46,75	4,6±0,1	3,2±0,1	61,77
Сепарация с раствором полиглобулина	3,4±0,2	2,38±0,2	20,6	1,8±0,2	1,26±0,2	24,32
Разделение в градиенте фикола	12,43±0,3	8,7±0,3	75,35	4,9±0,2	3,43±0,2	66,21
Обработка ПК лизирующим раствором	12,75±1,5	9,5±0,8	82,25	4,6±0,5	3,0±0,7	57,91

Следующим этапом нашей работы было определение наиболее оптимальных условий культивирования клеток пуповинной крови *in vitro*. Клетки ПК после сепарации в градиенте фикола культивировали на среде Игла MEM альфа модификация с 20% ППК и 500 ед/  $\text{см}^3$  ЛИ-фактора. В качестве сравнительной среды использовали среду mesencult (StemCell Technologies Inc). Результаты исследований представлены в таблице 2.

**Таблица 2** - Культивирования стволовых клеток пуповинной крови *in vitro*

Основные показатели	Условия культивирования клеток пуповинной крови	
	MEM ( $\alpha$ ) + 20% ППК + 500 ед/см ЛИ-фактора	Среда mesencult
Прикрепление клеток (часы)	24-48	24-48
Образование колоний (сутки)	5-6	3-4
Образование монослоя (сутки)	10-12	8-10

Как видно из таблицы 2 культивирование стволовых клеток ПК на среде Игла MEM ( $\alpha$ ) с 20% ППК и 500 ед/  $\text{см}^3$  ЛИ-фактора имеет сходную картину с культивированием на среде mesencult. Наблюдается лишь небольшое отставание в сроках образования колоний и монослоя.

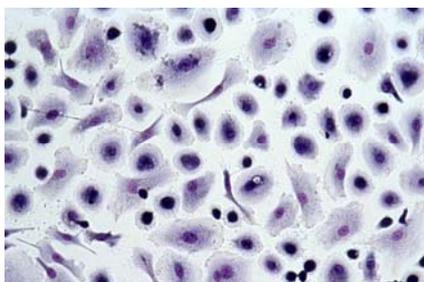
Для определения процента гемопоэтических стволовых клеток в культуре пуповинной крови, выращенной на среде Игла MEM ( $\alpha$ ) + 20% ППК и ЛИ-фактора (500 ед/  $\text{см}^3$ ), нами была проведена проточная цитометрия клеток на маркеры CD 34+, CD 38+ и CD 45+. Результаты представлены в таблице 3.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что культивирование клеток пуповинной крови на среде Игла МЕМ ( $\alpha$ ) + 20% СПК и Ли-фактора (500 ед/см<sup>3</sup>), приводит к значительному увеличению процента гемопоэтических клеток. Кратность экспансии CD 34+клеток достигает 4,4 раза, CD 38+ в 4,38 раза, наибольшую кратность экспансии достигают CD 45+ клетки в 11,4 раза.

**Таблица 3** - Результаты количественного учета гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови до и после культивирования *in vitro*

Основные параметры	Общее количество клеток X10 <sup>8</sup>	Количество CD34+ клеток X10 <sup>6</sup>	Количество CD38+ клеток X10 <sup>7</sup>	Количество CD45+ клеток X10 <sup>8</sup>
После сепарации	5,6±0,5	15,8±0,2	9,5±0,5	3,2±0,4
После культивирования	45,8±2,9	69,7±2,3	41,5±2,5	36,5±2,7
Кратность экспансии	8,3±1,2	4,40±0,5	4,38±0,6	11,40 ±0,4

Основная масса клеток в культуре представлена гемопоэтическими стволовыми клетками. Преимуществом данного метода является то, что при культивировании используется в основном аутологичная плазма, что полностью исключает возможность контаминации образца ПК возбудителями различных заболеваний.



увеличение 40X10, окраска по Гимза

**Рисунок 1** - 10 суточная культура клеток ПК

Таким образом, оптимальным условием культивирования клеток пуповинной крови человека является культивирование в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, используя в качестве среды Игла МЕМ ( $\alpha$ ) + 20% СПК и 500 ед/см<sup>3</sup> ЛИ-фактора, что позволило получить монослой на 10-12 сутки культивирования. Культивирование приводило к получению культур, состоящих из удлинённых дендритных клеток и эпителиоподобных клеток в соответствии с рисунком 1. Культуры клеток ПК в основном были представлены клетками лимфоцитарного ряда. Таким образом, при культивировании клеток ПК можно использовать менее дорогую среду Игла МЕМ ( $\alpha$ ) + 20% СПК и Ли-фактора (500 ед/ см<sup>3</sup>) и получить культуру стволовых клеток пуповинной крови.

### Литература

- 1 Исаев А.Л., Мелихова В.С. Применение клеток пуповинной крови в клинической практике //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.- Том III №1 2008 с.34-42
- 2 Rubinstein P. Why Cord Blood? // Human Immunology.- 2006.- 67.-P. 398-404
- 3 Rocha V., Gluckman E. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells // Biol Blood Marrow Transplant.- 2006.- 12.-P. 34-41
- 4 Wagner J.E., Barker J.N., DeFor T.E. et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival // Blood.- 2002.- 100.-P.-1611-18

### Тұжырым

Кіндік қаны жасушаларын фикола градиентінде бөліп алу оларды ары қарай *in vitro* жағдайында өсіруге тиімді әдіс болып табылады. Кіндік қаны жасушаларының өсіндерін фенотиптендіру гемопоэтикалық діндік жасушалардың экспансиясына әкеліп соқтырады.

## Summary

Division the cells of blood cords in gradient ficolls is an most optimum method for the further cultivation in vitro. Phenotyping cultures of the cells of blood cords shows the expansion a hemopoietic stem cells.

УДК. 581.163

Mukhambetzhano S.K.

## THE PHENOMENON OF APOMIXIS IN SOME MONOCOTYLEDONES

(Institute of Plant Biology and Biotechnology)

*In present article a short review of apomixis in Poaceae family and the description of the recent advances in the molecular and genetic characterization of apomixis has been done and apomixis using for breeding, biotechnology and gene engineering purposes.*

Apomixis is an asexual mode of reproduction in which an ovule develops into a seed without involving meiosis and fertilization. It is now used synonymously with 'agamospermy' meaning asexual reproduction by seeds or seed apomixes. This mode of reproduction is reported in more than 400 species belonging to 40 families [1].

For many years, apomixis was studied only by a small group of interested botanists and plant breeders. However, because of its tremendous potential for agriculture: rapid development of new hybrid varieties, economic hybrid seed production, propagation of hybrid seed, resistance against pathogens, handling propagation material.

In this case apomixis research has attracted much more attention during the last few years. If apomixis could be introduced into sexual crops, it would greatly simplify breeding schemes and allow the fixation of any genotype, including that of F1 hybrids. Apomixis technology could play a major role in feeding the growing population of our planet provided that it will be freely accessible to all users, especially resource-poor farmers in developing countries, requiring innovative approaches for technology generation, patenting, and licensing.

Current apomixis research focuses on elucidating the genetic basis and molecular mechanisms that control apomictic reproduction. Two major complementary approaches are being pursued: first, to identify genes controlling individual elements of apomixis in well-defined sexual model species and second, to unravel the genetic control of apomixis in natural apomixes. For nearly two decades, the genetic control of apomixis had been elucidated in very few species. Recently, however, inheritance studies for several natural apomixes have been published that shed new light on the genetic control of this important developmental process [2].

### Phenomenon of apomixis

In sexual reproduction meiosis reduces the chromosome number of the megaspore mother cell to form reduced megaspores, one of which develops into an embryo sac containing the female gamete (the egg cell). In most plants these embryo sacs have eight nuclei and are described as *Polygonum* type. The fusion of two unique haploid gametes, derived from the random assortment of the genetic material occurring during meiosis, results in the generation of diploid and genetically diverse progenies. In contrast, in apomictic reproduction, the embryo develops autonomously an unreduced cell having the same set of maternal chromosomes and giving rise to plants that are clones of the mother plant [2].

Apomictic plants are the result of either one of two types of development, sporophytic or gametophytic. In sporophytic apomixis or adventitious embryony, embryos are formed directly from unreduced cells of the nucellus, or inner integument, while the developmental pathway of meiotic embryo sac is maintained. Gametophytic apomixis is characterized by apomeiosis. Meiosis is either altered or totally bypassed, and as a consequence, an unreduced female gametophyte, or embryo sac, is formed. There is no fusion of male and female gametes and the egg cell develops autonomously, by parthenogenesis, generating an embryo that keeps the same set of maternal chromosomes. Apospory and diplospory are different types of gametophytic apomixes. In diplospory, the megaspore mother cell bypasses or fails to achieve meiosis, but through mitosis forms an embryo sac with all unreduced cells distributed as in the meiotic embryo sac of the *Polygonum* type. In this case, the sexual process is completely compromised. In apospory some nucellar cells, called aposporous initials enter in mitosis directly and unreduced embryo sacs are formed. Sexuality and apospory can occur simultaneously in the same ovule. If fertilization of the central cell is necessary to form the endosperm, the system is regarded as pseudogamous, if not, it is autonomous [3].