

Пролиферативная активность мезенхимальных стволовых клеток из различных частей плаценты

УДК: 57.085.23:[576.5+612.017.1]

Янина Исайкина,
завлабораторией
клеточных биотехнологий
и цитотерапии научного
отдела РНПЦ детской
онкологии, гематологии
и иммунологии,
кандидат биологических
наук; yaninai@mail.ru

Елена Лях,
научный сотрудник
РНПЦ детской
онкологии, гематологии
и иммунологии;
lyakchelena@gmail.com

Мария Новикова,
младший научный
сотрудник РНПЦ детской
онкологии, гематологии
и иммунологии;
power_shine@mail.ru

Юлия Савич,
младший научный
сотрудник РНПЦ детской
онкологии, гематологии
и иммунологии;
julia90pekhotatut.by

Людмила Кеда,
главный специалист
отдела медицинской
помощи матерям и детям
Главного управления
организации медицинской
помощи Министерства
здравоохранения
Республики Беларусь

Аннотация. Исследовано содержание мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в различных частях плаценты и их кинетика роста *in vitro*. Доказано, что пролиферативная активность МСК из децидуальной оболочки и ворсин хориона не отличается и позволяет в течение 3 мес. увеличить первоначальное количество клеток в 10^{10} раз, что в 10^4 раз выше, чем МСК из амниона. Содержание колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) в хорионе и децидуальной оболочке сопоставимо и достоверно выше, чем в амнионе, но не отличается от КОЕ-Ф в костном мозге. Кумулятивное популяционное удвоение МСК плаценты на всех пассажах достоверно выше, чем МСК костного мозга. Децидуальная оболочка и хорион плаценты – идеальные источники для экспансии МСК, которые в дальнейшем могут быть зарезервированы в банке клеток и использованы в клеточной терапии, особенно при требовании высоких доз МСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, плацента, децидуальная оболочка, хорион, амнион, КОЕ-Ф, популяционное удвоение.

Для цитирования: Исайкина Я., Лях Е., Новикова М., Савич Ю., Кеда Л. Пролиферативная активность мезенхимальных стволовых клеток из различных частей плаценты // Наука и инновации. 2021. №7. С. 76–80.
<https://doi.org/10.29235/1818-9857-2021-7-76-80>

Мезенхимальные стволовые клетки широко используются в регенеративной медицине и клеточной терапии иммуноопосредованных заболеваний благодаря их противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствам, а также способности к дифференцировке в клетки различных тканей [1, 2].

В клинической практике в основном применяются МСК, выделенные из костного мозга и жировой ткани. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал их достаточно изучен, разработаны протоколы получения и доказана безопасность применения для пациентов. К недостаткам клеток из этих источников относится не только инвазивная процедура забора костного мозга и жировой ткани под анестезией, но и ограниченный пролиферативный и дифференцировочный потенциал костномозговых МСК [3]. Наиболее проблематичным является наращивание достаточного для эффективной терапии количества МСК из костного мозга немолодых пациентов, так как существует обратная зависимость между содержанием этих клеток и их пролиферативной активностью, с одной стороны, и возрастом человека, с другой [4].

Послеродовая плацента в качестве альтернативного источника МСК привлекает доступностью исходного материала, отсутствием оперативного вмешательства для его извлечения и возможностью получить десятки аллогенных биомедицинских продуктов МСК из 1 единицы плаценты благодаря мощному пролиферативному потенциалу этих клеток. Использование аллогенных МСК для этой цели перспективно только в том случае, если они достаточно хорошо размножаются в культуре

при небольшом количестве пассажей, благодаря чему накапливается большая клеточная масса без мутаций, приводящих к неопластической трансформации клеток [5].

Анатомическое строение плаценты позволяет выделять МСК как из ее плодной части: амниотической оболочки, ворсин хориона, так и из материнской – децидуальной оболочки (*decidua basalis*) [6, 7]. Методы изоляции этих клеток из различных областей плаценты и их свойства изучались многими авторами за последнее десятилетие. Их пролиферативный потенциал и пластичность описаны в ряде работ [8–10].

Пролиферативная активность различных популяций плацентарных МСК неодинакова, и на сегодняшний день нет однозначного мнения, из какой части послеродовой плаценты МСК воспроизводятся более интенсивно – из децидуальной оболочки, как утверждают одни авторы, или из хориона, как отмечают другие [11, 12]. Исследований же, где проведен сравнительный анализ содержания и кинетики роста МСК из разных частей плаценты *in vitro*, а также определены области послеродовой плаценты, обработка которых обеспечивает наибольший выход клеточной массы МСК, мало, и результаты их противоречивы [13, 14].

Применение МСК доказало свою эффективность при лечении реакции «трансплантат против хозяина» и ряда аутоиммунных заболеваний: системной красной волчанки, синдрома Шегрена, болезни Крона и других, что напрямую связано с их способностью модулировать иммунный ответ *in vivo* путем взаимодействия с широким спектром иммунных клеток. Однако для получения устойчивого

ответа иногда требуется повышение кумулятивной дозы МСК более 10×10^6 /кг или увеличения кратности введения клеток до 4 и более [15]. Банкирование аллогенных МСК плаценты позволит решить проблему их использования по первому требованию и в любом количестве, обеспечивающем проведение эффективного лечения пациентов различных возрастных групп.

Цель нашего исследования – сравнительная оценка пролиферативного потенциала МСК из децидуальной оболочки, хориона и амниона плаценты и установление наиболее перспективной для заготовки и резервирования в банке клеток популяции для последующего использования в терапии.

Материалы и методы

МСК выделяли ферментативным методом из фрагментов плаценты, полученной после оперативных родов путем кесарева сечения. Ткани плаценты подвергали механической обработке и переносили в раствор коллагеназы I на 30 мин. с последующей фильтрацией клеток через 100 μ m нейлоновый фильтр. Диссоциированные клетки высаживали в культуральные флаконы в среду IMDM с 10% ЭТС и культивировали при 37 °C в CO₂ инкубаторе до достижения 80%–90% конфлюэнтного слоя, снимали с поверхности флакона 0,25% раствором трипсин – ЭДТА, получая первичную культуру. Ее клетки рассаживали по новым флаконам в концентрации 1×10^6 в среду IMDM с 10% ЭТС с последующим пассированием через 7 суток. Таким образом проводили 9 пассажей.

Также МСК выделяли из проб костного мозга здоровых людей, являвшихся донорами

гемопоэтических стволовых клеток для аллогенной трансплантации (n=10) и выполняли 6 пассажей. Так как пролиферативная активность этих клеток хорошо изучена и может служить «золотым стандартом», одной из целей было провести сравнительную оценку их параметров с аналогичными показателями МСК плаценты.

Для исследования количественного содержания МСК среди клеток ткани плаценты и их способности к воспроизведению выполняли клоногенный тест с подсчетом КОЕ-Ф. Клетки плаценты после ферментативной обработки или моноклеарные клетки костного мозга в количестве 1×10^6 ресуспендировали в полной среде, состоящей из IMDM с добавлением 15% ЭТС, L-глутамина, 2-меркаптоэтанола, 10^{-6} м/л гидрокортизона (все реагенты фирмы Sigma, США), переносили в чашку Петри размером 60 мм и культивировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение 14 дней. После фиксации метанолом колонии окрашивали красителем Гимза и подсчитывали под инвертированным микроскопом.

Пролиферативную активность МСК в культуре оценивали, определяя популяционное удвоение (ПУ) клеток в каждом пассаже. Рассчитывали ПУ на выходе, зная исходное количество клеток для данного пассажа, с применением формулы:

ПУ = $\log(\text{кол-во клеток на выходе}) / \log 2(\text{кол-во клеток исходное})$.

Для анализа результатов использовали программу STATISTICA 6.0. Применяли непараметрические методы: достоверность различий между независимыми выборками оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни, проверку различий между двумя выборками парных измерений осуществляли с помощью T-критерия Вилкоксона.

Результаты исследования

МСК, выделенные из децидуальной оболочки, хориона и амниона всех плацент (n=12) морфологически не отличались и имели фибробластоподобную форму с 1-го по 9-й пассажи. Сохранение характерной веретенообразной морфологии кле-

ток при долгосрочном культивировании МСК из разных частей плаценты также подтверждается и в других работах [14, 16].

Анализ содержания МСК в различных частях плаценты и их способности к самовоспроизведению по оценке КОЕ-Ф показал, что среднее число КОЕ-Ф на 1×10^6 клеток, выделенных из децидуальной оболочки, хориона и амниотической пластины, составляло $19,7 \pm 9,4$, $10,3 \pm 1,7$ и $6,3 \pm 0,9$ соответственно и не отличалось от КОЕ-Ф цельной плаценты $12,2 \pm 2,6$. При этом среднее количество КОЕ-Ф из клеток децидуального слоя было достоверно выше, чем из амниотической мембраны ($p < 0,05$) (рис. 1). Необходимо отметить, что в нашем исследовании наблюдался широкий диапазон значений КОЕ-Ф из децидуальной оболочки (от 2 до 34 на 1×10^6 клеток плаценты) в зависимости от донора.

Похожие выводы сделаны Choi YS. с соавторами, которые установили, что МСК можно выделить из всех частей плаценты, но больше всего активно

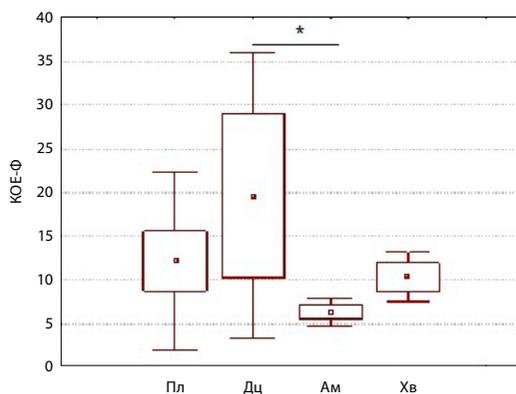


Рис. 1. Количество колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф): Пл – цельная плацента, Дц – децидуальная оболочка, Хв – ворсины хориона, Ам – амниотическая мембрана
* $p < 0,05$

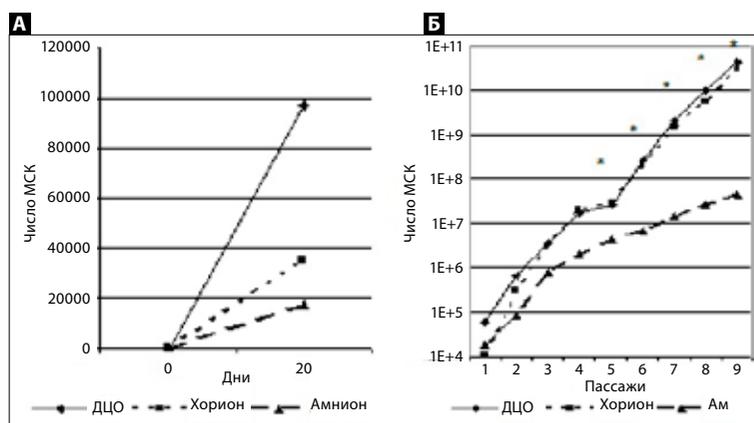


Рис. 2. Динамика роста МСК из материнской и плодной частей плаценты: децидуальной оболочки (ДЦО), ворсин хориона (Хв), амниотической мембраны (Ам); А – рост МСК в первичной культуре, Б – рост МСК в течение 9 пассажей
* $p < 0,05$

самовоспроизводящихся экзепляров в децидуальной ткани, а меньше – в амнионе [14].

Результаты оценки кинетики роста МСК *in vitro* выявили отсутствие достоверной разницы в количестве клеток в первичной культуре (до проведения 1-го пассажа), полученной из децидуальной оболочки, хориона и амниотической мембраны, число которых составляло $9,7 (1,2-24,1) \times 10^4$, $3,5 (1,1-9,2) \times 10^4$ и $1,7 (9,2-25,5) \times 10^4$ соответственно (рис. 1А). При этом число МСК из децидуальной оболочки приумножилось более чем в 5700 раз, тогда как из хориона – в 3700 раз, а из амниотической мембраны – в 3200 раз.

МСК первичной культуры, полученные из каждой части 4 образцов плаценты, экспансировали *in vitro* на протяжении 92 суток с проведением 9 пассажей. Кривые роста клеток показали, что с 1-го по 9-й пассаж количество МСК децидуальной оболочки увеличилось в $3,5 \times 10^5$ раз, хориона – в $9,9 \times 10^5$ раз, а амниотической мембраны всего в 2×10^3 раз (рис. 2Б).

Таким образом, пролиферативная активность МСК, выделенных из децидуальной оболочки и хориона, не отличается как при росте в первичной культуре, так и на протяжении 9 пассажей, и в обоих случаях наблюдается приумножение клеток более чем в 10^{10} раза с момента их посева. Пролиферативная активность МСК из амниотической мембраны ниже и, начиная с 5-го по 9-й пассажи, выход клеток достоверно отличается от количества МСК децидуальной оболочки и хориона ($p < 0,05$), а после 9 пассажей среднее число МСК амниотической мембраны \approx в 1000 раз ниже, чем МСК из децидуальной оболочки и хориона. Наши результаты согласуются

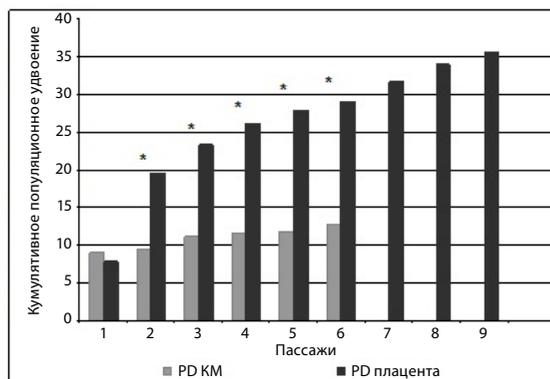


Рис. 3. Совокупное популяционное удвоение (ПУ) при культивировании МСК плаценты и костного мозга * – $p < 0,05$

с данными Choi YS и соавторов, полученными при исследовании пролиферативного потенциала мезенхимальных стволовых клеток из 6 различных слоев послеродовой плаценты и показавшими, что активность МСК из ворсин хориона, хорионической мембраны и децидуальной оболочки выше, чем из амниотической мембраны и эпителия амниона [14]. С другой стороны, Indumathi S. с соавторами, оценивая кривые роста МСК и время удвоения клеток, пришли к выводу, что пролиферативный потенциал МСК децидуальной оболочки значительно выше, чем МСК хориона и амниона, и поэтому именно первый вариант может быть наиболее востребован для резервирования [13]. Так же и Soncini M. с соавторами отмечали, что МСК из материнских слоев плаценты обладают большей продолжительностью жизни и способностью к экспансии, чем из плодных [17].

Сравнительная оценка содержания и кумулятивного популяционного удвоения МСК плаценты с аналогичными параметрами МСК костного мозга показала, что среднее количество КОЕ-Ф костномозгового происхождения ($n=10$) на 1×10^6 мононуклеарных клеток составляло $11,6 \pm 1,8$, что сопоставимо с числом КОЕ-Ф из разных частей плаценты. Наши результаты

согласуются с ранее опубликованными данными Петровского и соавторов: исходное количество КОЕ-Ф в плацентарной ткани и в костном мозге не отличается [18]. Однако Н. Wegmeyer с коллегами при исследовании материала из 5 плацент сделали заключение, что КОЕ-Ф из амниона различных доноров в 25–6600 раз больше, чем из костного мозга [19].

Наши наблюдения кинетики роста МСК костного мозга и плаценты выявили, что в культуре первые начинали «стареть» уже на 4-м пассаже, изменяя форму с веретенообразной на распластанную с «рваными краями», и к 6-му пассажу пролиферация клеток прекращалась во всех пробах, тогда как вторые продолжали активно делиться до 9-го пассажа включительно, сохраняя характерную для них морфологию.

Нами рассчитано ПУ для МСК как плаценты, так и костного мозга для каждого пассажа и совокупное ПУ, которое является одной из характеристик «старения» культивируемых клеток в ограниченно пролиферирующих клонах. При росте в основной культуре стволовые клетки плаценты проходили в среднем $7,9 \pm 1,2$ популяционных удвоений, что не отличалось от МСК костного мозга – $8,9 \pm 0,4$. В субкультуре со 2-го по 6-й пассажи

экспансия клеток плаценты была достоверно более мощная и на 6-м пассаже ПУ составляло $29 \pm 2,3$, тогда как для культуры МСК костного мозга – $12,7 \pm 2,2$ ($p < 0,05$) (рис. 3). Значительно более высокая пролиферативная активность МСК плаценты по сравнению с выделенными из костного мозга установлена и в других работах [20, 21].

В исследовании изучалось содержание и пролиферативный потенциал МСК, выделенных из костного мозга доноров старше 30 лет, у которых эти показатели, как известно, ниже, чем у МСК из костного мозга детей. Полученные нами данные объясняют трудности в получении достаточной дозы МСК *in vitro* из костного мозга пациентов и доноров зрелого и пожилого возраста, особенно если клетки требуются для лечения реакции «трансплантат против хозяина», при которой в настоящее время совокупная доза внутривенно вводимых костномозговых МСК доходит до 20×10^6 клеток/кг веса пациента [22].

Заключение

Исследование кинетики роста МСК плаценты *in vitro* и оценка кумулятивного популяционного удвоения клеток подтвердили, что пролиферативная активность МСК, выделенных из децидуальной оболочки и из хориона, не отличаются при росте клеток как в основной культуре, так и в субкультуре до 9-го пассажа включительно, и в обоих случаях первоначальное количество МСК может быть увеличено в 10^{10} раз в течение 3 мес. культивирования, что в 10^4 раз больше, чем при культивировании МСК из амниона ($p < 0,05$). Содержание КОЕ-Ф в хорионе и децидуальной оболочке сопоставимо и составляло

$10,3 \pm 1,7$ и $19,7 \pm 9,4$ соответственно, что выше, чем КОЕ-Ф в амниотической мембране – $6,3 \pm 0,9$ ($p < 0,05$), но не отличалось от числа КОЕ-Ф в костном мозге – $11,6 \pm 1,8$. При экспансии в субкультуре кумулятивное популяционное удвоение МСК плаценты на всех пассажах было достоверно выше, чем у МСК костного мозга, деление которых после 6-го пассажа прекращалось. Таким образом, результаты нашей работы подтверждают, что деци-

дуальная оболочка и хорион плаценты являются идеальным источником для получения большой массы МСК, которые могут быть зарезервированы в банке клеток и применены для клеточной терапии, особенно при требовании высоких доз МСК для обеспечения устойчивого терапевтического эффекта. ■

Статья поступила в редакцию
28.09.2020 г.

■ **Summary.** The ability of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the decidua, chorionic tissue and amniotic membrane of the placenta to the self-renewal and the proliferation was investigated. Our results revealed that the number of colony forming unit-fibroblast (CFU-F) and the growth rate of MSCs were higher in the decidua and chorionic tissue compared to the amniotic membrane. Decidua MSCs and chorionic MSCs possessed a similar powerful proliferative potential and increased in 1010-fold in cultures for 3 months, that is 103 times more than the amniotic MSCs. The cumulative population doubling (PD) of placenta-derived MSCs was significantly higher at all passages than PD of bone marrow derived MSCs. The decidua and chorionic tissue of the placenta are ideal MSCs sources for cell based therapy.

■ **Keywords:** mesenchymal stem cells, placenta, deciduas, chorionic tissue, amniotic membrane, CFU-F, population doubling.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2021-7-76-80>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bianco P. [et al.]. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine // Nat Med. 2013. №19. P. 35–42.
2. Pittenger M.F. [et al.]. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. 1999. №284. P. 143–147.
3. Paczesny S. [et al.]. Mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation // Curr Stem Cell Res. 2009. №4. P. 252–259.
4. Stenderup K. [et al.]. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells // Bone. 2003. 33. P. 919–926.
5. Crisostomo PR [et al.]. High passage number of stem cells adversely affects stem cell activation and myocardial protection // Shock. 2006. №26. P. 575–580.
6. Witkowska-Zimny M. [et al.]. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion // Cell Mol Biol Lett. 2011. №16. P. 493–514.
7. Hass R. [et al.]. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC // Cell Commun Signal. 2011. Vol. 9. P. 12–18.
8. Sabapathy V. [et al.]. Longterm cultured human term placenta-derived mesenchymal stem cells of maternal origin displays plasticity // Stem cells Int. 2012. // <http://dx.doi.org/10.1155/2012/174328>.
9. Igura K. [et al.]. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta // Cytotherapy. 2004. №6. P. 543–553.
10. Warrior S. [et al.]. Inherent propensity of amnion-derived mesenchymal stem cells towards endothelial lineage: vascularization from an avascular tissue // Placenta. 2012. №33(10). P. 850–858.
11. Gonza'lez P.L. [et al.]. Chorion mesenchymal stem cells show superior differentiation and immunosuppressive and angiogenic potential comparison with haploidentical maternal placental cells // Stem Cells Transl Med. 2015. №4. P. 1–13.

Полный список использованных источников размещен

 [SEE http://innosfera.by/2021/07/stem_cells](http://innosfera.by/2021/07/stem_cells)