

УДК 576.535+591.39+612.119

Д.І. Білько, Н.М. Білько

Національний університет «Києво-Могилянська академія», м. Київ

ПОТЕНЦІЙНІ МОЖЛИВОСТІ РАННІХ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН ФОРМУВАТИ ГЕМОПОЕТИЧНІ КЛІТИНИ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН IN VITRO

Ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) є плюрипотентними. Нещодавно показано, що ЕСК можуть диференціюватися у різні спеціалізовані клітини і моделювати процес раннього ембріогенезу. Досліджували ЕСК методом «висячої краплі» *in vitro*. Цистоподібні утворення, які отримали назву «ембріодні тільця», формувалися у спеціальних умовах за наявності комплексу ростових факторів. Проаналізували шляхи диференціювання ЕСК у гемопоетичні. Результати розглядаються як підґрунтя для розробки моделі дослідження ранніх подій у ембріогенезі і пошуку шляхів для накопичення соматичних попередників і диференційованих клітин для трансплантацій.

Ключові слова: ембріональна стовбурова клітина, культура *in vitro*, ембріодні тільця, гемопоез, трансплантація.

Ідентифікація умов диференціювання, яка б забезпечувала комітування ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) у різні клітини, і особливо пошуки шляхів для управління цими процесами є найбільш вагомим та бажаним методом досліджень, пов'язаних з культивуванням клітин. Культуру ЕСК ссавців у лабораторії вперше вдалося отримати у 1981 р. та лише через майже 20 років (у 1998 р.) вдалося отримати стовбурову плюрипотентну клітину з раннього ембріона людини. Проте вже через декілька років після цього відкриття стало відомо, що ЕСК здатна не лише до широкого диференціювання, а й має потенціал заміщувати клітини багатьох органів та тканин: серцевої, панкреатичної і навіть нервової [1, 2].

Дослідженнями останніх років доведено існування тотипотентної ЕСК як родоначальника всіх клітинних популяцій та організму в цілому [3–6]. Розробка ембріональних клітинних ліній сприяла вивченню клітин різних напрямків диференціювання поза організмом за умов культивування *in vitro*. Doetchman у 1985 р. повідомив про те, що диференціювання ЕСК у суспензійній культурі може дати ріст еритроцитів *in vitro* [7]. Інші дослідники описали наявність макрофагів, лімфоцитів, нейтрофілів та тучних клітин під час диференціювання ЕСК у культурі *in vitro* [2]. Є недавні повідомлення про довготривалий лімпопоез

опромінених мишей, яким вводили диференційовані ЕСК як джерело кровотворних клітин [8].

Нещодавно в культурі ембріональних клітин за наявності комплексу ростових факторів отримані цистоподібні утворення, які назвали «ембріодними тільцями». Вони є аналогами жовткового мішка на ранніх етапах розвитку ембріона і утворюються плюрипотентними стовбуровими клітинами [9–11]. Дані щодо розвитку гемопоетичних клітин з ембріодних тілець суперечливі. Частина вчених стверджують, що гемопоез з'являється на 8–10-ту добу [12], інші — на 4-ту добу [13]. Невідомо, коли саме виникають перші кровотворні клітини, який шлях диференціювання вони обирають, яка їх функціональна активність, немає вичерпної інформації про те, як впливають ці чи інші комплекси цитокінів на напрям диференціювання клітин і його інтенсивність. Для досягнення цієї мети необхідні моделі для вивчення основ молекулярного і клітинного контролю гемопоезу в нормі і патології, які могли би поглибити розуміння фундаментальних подій розвитку ембріона, причин вроджених дефектів і шляхів їх виправлення або запобігання.

Матеріал і методи. Як джерело плюрипотентних ембріональних клітин використовували ES-клітини [10, 13]. Лінію плюрипотентних ембріональних мишиних клітин

© Д.І. Білько, Н.М. Білько, 2011

(wild type $D_3 R_1$) підтримували у недиференційованому стані кокультуванням з міотично інактивованими фібробластоподібними клітинами ембріона миші. Щільність клітин доводили до $3 \cdot 10^4$ /мл культуральним середовищем (Iscove's IMDM, 20 % фетальної сироватки, 2 мМ L-глутамін, 1,2 мМ L-монотіогліцерол). Додавали 100 Од/мл лейкемієінгібуючого фактора DIA/LIF (Sigma).

Культування клітин проводили методом «вісячої краплі» [14, 15]. У 9 см^2 пластикову чашку Петрі на дно поміщали 10 мл дистильованої води. На внутрішню поверхню кришки переносили краплини із суспензією клітин по 20 мкл, дотримуючись помірної дистанції, щоб уникнути злиття (приблизно 75–80 крапель може розміститися на 1 кришці). Кришку перегортали і закривали нею чашку. Переносили чашку в CO_2 -інкубатор (7,5 %) за умов абсолютної вологості та культивували вісячі краплини 2 дні. Після 2 днів культивування ЕСК розміщали на вершині вісячої краплини та проліферували, утворюючи однорідні сферичні тіла однакових розмірів, тобто ембріодні тільця.

Зміна середовища відбувалася кожні 2 дні. Нарощування маси ембріодних тілець (100 агрегатів/мл) проводили у повному живильному середовищі за наявності LIF у мікробіологічних чашках Петрі (9 см^2 у діаметрі), до яких агрегати не прикріплюються. Через 3–5 діб ЕТ переносили у желатинізовані 96-коміркові планшети, по одному ЕТ на комірку. Частина комірок залишали для культивування протягом місяця, замінюючи середовище кожні 2–3 дні. Для аналізу виходу клітин гемопоетичного напрямку диференціювання кожного дня супернатант центрифугували і робили препарати на предметних скельцях. Забарвлення проводили за Романовським–Гімзою. Препарати готували на цитоцентрифузі Shandon 3 (USA) і аналізували під світловим мікроскопом фірми Zeiss (Німеччина).

Результати та їх обговорення. Культивування ранніх ембріональних клітин миші в культурі *in vitro* призводило до формування ЕТ на другу добу інкубації. ЕТ нагадували сферичні цисти розміром декілька сот мікрон. «Дозрівання» ЕТ протягом 3–4 діб у мікробіологічних планшетах досяглося за наявності LIF, а індукція диференціювання відбувалася шляхом переносу ЕТ у желатинізовані 96-коміркові планшети, де з живильного середовища був видалений LIF, що спричиняло інтенсифікацію спонтанного

диференціювання клітин у кардіоміоцитарному напрямку, які виявляли завдяки ритмічним синхронізованим скороченням частин ЕТ та появою нервових клітин, згідно з їх морфологічною характеристикою і експресією відповідних генів. За допомогою використання спеціалізованих специфічних моноклональних антитіл групою дослідників у цих клітинах досліджувалася експресія генів міозину, нестину і променіну [16]. Одночасно з ЕТ у процесі їх культивування у повному живильному середовищі нами були отримані і гемопоетичні клітини [16, 17]. Раніше автори вважали, що гемопоетичний напрям диференціювання можна дослідити тільки зі зруйнованих ЕТ. Ріст еритроїдних клітин у культурі з ембріодних тілець був описаний Keller у 1995 р., але у пізніші строки (8–9-й день) [12].

Кілька закономірностей виявлено під час культивування ЕТ щодо гемопоезу. По-перше, за оптимальних умов гемопоетичні клітини визначаються у більшості випадків. Так, при культивуванні у 96-коміркових планшетах гемопоетичні клітини знаходили у 70–80 % комірок. По-друге, комітування у гемопоез відбувається при відсутності ростових факторів за виключенням тих, які знаходяться у фетальній телячій сироватці. Культивування у *serum-free* культурах демонструвало незначне гемопоетичне комітування. Дослідники пов'язують цей факт із наявністю у сироватці BMP-4 (*bone morphogenetic protein 4*), який індукує гематопоез у ЕТ [12].

Крім того, не можна заперечувати, що саме ЕТ забезпечує мікрооточення та суміш паракринних факторів, які сприяють гемопоезу. Підтвердженням цьому є наявність експресії генів відповідних ростових факторів і рецепторів ростових факторів, які експресуються у процесі розвитку ЕТ [10]. По-третє, виявилось, що черговість подій у ембріоні і ЕТ співпадають. Так, відомо, що вперше великі ядерні еритроїдні клітини у миші з'являються у кровотворних островках жовткового мішка на 7–8-й день гестації. Вони містять ембріональні форми глобіну і представляють головну популяцію серед гемопоетичних клітин у період раннього розвитку. Згідно з класичними уявленнями, на 9–10-й день ріст бластоподібних і примітивних еритроїдних клітин продовжує підтримуватись у фетальній печінці. Те ж саме ми спостерігали і при культивуванні ЕТ (рис. 1). На відміну від подій у фетальній печінці поява ранньої еритроїдної популяції

у межах ЕТ припадає на 4-ту добу диференціювання. У той самий час виявляються і поодинокі мієлоїдні клітини, які згодом переважають, саме на 10–12-й день, коли зовсім зникає примітивна еритроїдна популяція як *in vitro*, так і *in vivo*.

мікроскопічного дослідження. І у зв'язку з тим що вони не визначаються під світловим мікроскопом безпосередньо і не відрізняються за кольором, як еритроцити, складається думка, що гемопоетичні клітини у цей час відсутні.

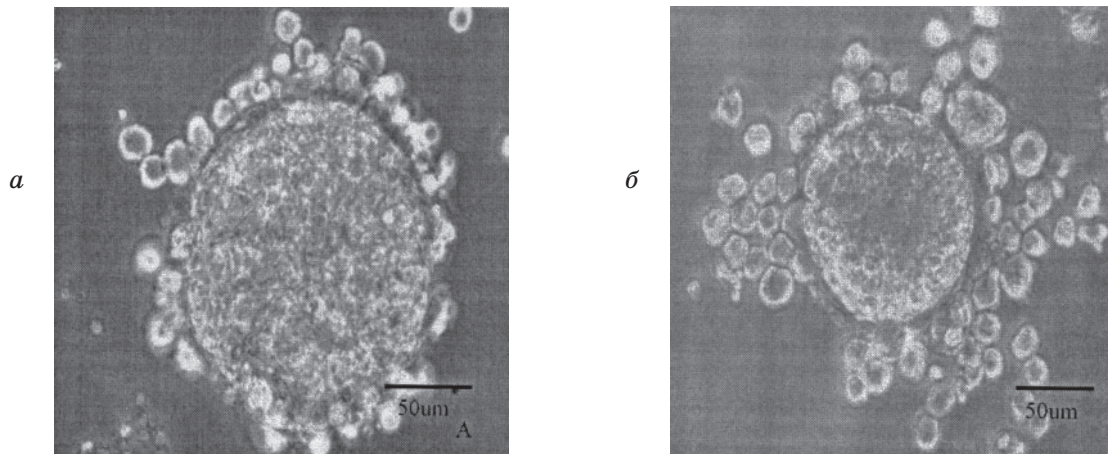


Рис. 1. ЕТ, отримані з ембріональної стовбурово-клітинної лінії wild D₃ R₁ у різні терміни культивування *in vitro*: а — 7 діб; б — 14 діб. Інвертований мікроскоп, × 600

Результати роботи свідчать про те, що механізми, які залучені до формування системи гемопоезу *in vivo*, функціонують і *in vitro*. Лімфоїдні клітини протягом культивування не виявлялись. Проте є повідомлення, що вони з'являються пізніше, ніж еритроїдна і гранулоцитарно-макрофагальна популяція, на 15–20-й день і складають 10 % від мієлоїдної популяції. Для їх отримання потрібні спеціальні умови, такі як фідерний шар зі стромальних клітин, середовище із низьким вмістом кисню чи іморталізація з ретровірусом [16].

Ми отримали гемопоетичні клітини з супернатанту, тобто з середовища, яке покривало ЕТ під час культивування. Нами було проведено морфологічний аналіз клітинних елементів з супернатанту на препаратах, виготовлених на цитоцентрифузі (рис. 2). Виявилось, що гемопоез ЕТ на зазначених термінах культивування був представлений бластоподібними клітинами, макрофагами і зрілими мієлоїдними формами. Перенесення цих клітин у наступну культуру з напіврідким агаром із додаванням гранулоцитарно-макрофагального фактора показало, що перенесені клітини є клонотипними та колонієутворюючими одиницями [3]. Ефективність клонування гемопоетичних клітин-попередників визначалась за про-

Отримані нами дані вказують на те, що гемопоетичні клітини мігрують з ембріоїдного тільця одночасно з нервовими, але вони не виявляються за морфологією під час

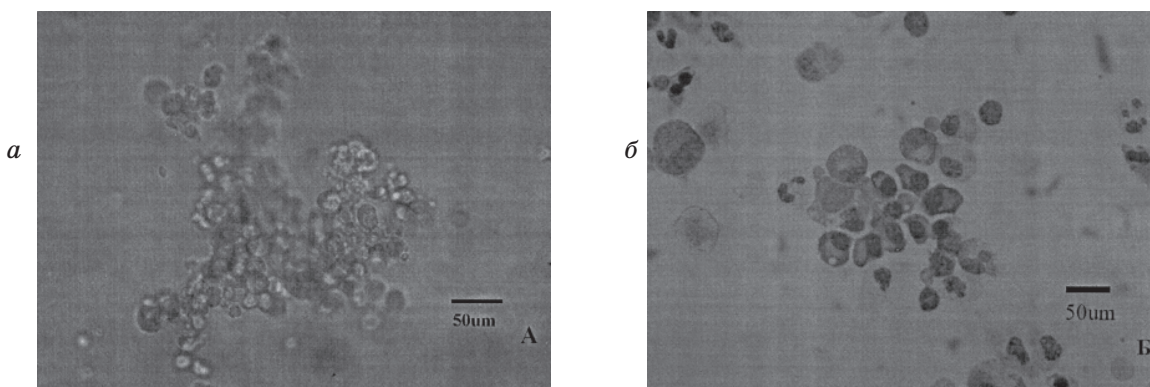


Рис. 2. Колонія в напіврідкому агарі, яка виросла з клітин супернатанту культури ЕТ на 2-й день після прикріплення до поверхні комірки ЕТ, інвертований мікроскоп, × 400 (а). Гемопоетичні (еритроїдна і гранулоцитарні) клітини, виділені з цієї колонії, забарвлення за Романовським–Гімзою, × 900 (б)

центним співвідношенням до експлантованих ЕТ. Виходячи з того, що в 1 комірку падає 1 ЕТ, наявність кровотворних клітин була відмічена у 70–80 % комірок.

Використання іншого шляху визначення клоногенних кровотворних клітин (руйнування ембріодних тілець) з наступним культивуванням отриманих клітин у напіврідкому агарі *in vitro* призводило до формування у культурі малих компактних колоній починаючи вже з першої доби. Ці колонії склалися з недиференційованих малих за розміром бластоподібних клітин, які надалі не продукували гемопоетичних клітин. Вважається, що саме ці колонії є мірилом мультипотентності клоногенних клітин. Тільки пізніше, на 4-й день культивування визначалися перші гемопоетичні колонії з комітованих клітин-попередників. Великі колонії визначалися у процесі диференціювання у двотижневий термін. Важливо відмітити, що кількість колоній, які продукувались, була відносно малою по відношенню до кількості зруйнованих ЕТ. Так, одне зруйноване ЕТ забезпечувало ріст 1 або 2 гемопоетичних колоній ($1,5 \pm 0,5$). Їх кількість не підвищувалась зі збільшенням терміну культивування і вірогідно не відрізнялась від результатів культивування на наступні дні ($p < 0,05$).

Еритроїдні гемоглобінізовані колонії в культурі визначалися на 8-й день. Їх кількість не перевищувала колонієутворення гранулоцитарно-макрофагальних попередників і дорівнювала відповідно $1,2 \pm 0,3$. Між іншим, завдяки червоному кольору саме ці колонії вперше були описані Keller у 1993 р. [8], який пов'язав їх появу з початком гемопоезу, хоча це був вже результат диференціювання еритроїдних клітин протягом кількох днів.

Список літератури

1. Тотипотентная стволовая клетка и гемопоез / Н. М. Билько, К. Брумбаров, М. Кросс, А. Вобус // Ветеринарная патология. — 2003. — № 1 (5). — С. 22–24.
2. Brook F. A. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse / F. A. Brook, R. L. Gardner // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — V. 94. — P. 5709–5712.
3. Cerdan C. Formation and hematopoietic differentiation of human embryoid bodies by suspension and hanging drop cultures / C. Cerdan, S. H. Hong, M. Bhatia // Current Protocols in Stem Cell Biology. — 2007. — Ch. 1. — Unit 1D.2.
4. Cheng L. Sustained gene expression in retrovirally transduced, engrafting human hematopoietic stem cells and their lympho-myeloid progeny / L. Cheng, C. Du // Blood. — 1998. — V. 92. — P. 83–92.
5. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium / T. C. Doetschman, H. Eistetter, W. Katz [et al.] // J. Embryol. Exp. Morphol. — 1985. — V. 87. — P. 27–45.
6. Evans M. J. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos / M. J. Evans, M. H. Kaufman // Nature. — 1981. — V. 292. — P. 154–156.

Таким чином, аналіз результатів культуральних досліджень показав, що гемопоез в культурі *in vitro* починається вже в перші дні після адгезії ЕТ до желатинізованої поверхні комірки одночасно з кардіоміоцитами і нервовими клітинами, які в цей термін описували Wobus зі співавт. [15]. Наявність саме гемопоетичних клітин не була визнана раніше у зв'язку з особливостями їх функціонування в культурі за таких умов. Тому першими дослідники виявили кардіоміоцити за їх скороченнями, нервові клітини — за їх характерною морфологією з гіллястими відростками [3, 10]. Беручи до уваги те, що гемопоетичні клітини не адгезують, ми провели дослідження супернатанту на наявність цих клітин. Аналіз препаратів, отриманих за допомогою цитоцентрифуги, показав, що процес формування гемопоетичних клітин відбувається одночасно із формуванням зазначених типів клітин. Виявилось, що без додаткових факторів гемопоез у культурі підтримується протягом місяця. Продовження досліджень у цьому напрямку безумовно дасть нові дані про функціонування ранніх гемопоетичних клітин на первісних етапах розвитку. Результати аналізу проліферативного потенціалу поліпотентних кровотворних стовбурових клітин і їх найближчих нащадків у процесі диференціювання ЕСК у культурі тканин *in vitro* розглядаються нами як підґрунтя для створення моделі, за допомогою якої буде продовжено вивчення механізмів молекулярного і клітинного контролю первісних етапів гемопоезу в нормі і патології.

Науково-дослідницька робота фінансувалася Фондом фундаментальних досліджень Міністерства освіти і науки України і виконувалася на базі Центру молекулярних і клітинних досліджень НаУКМА.

7. *Hole N.* Embryonic stem cell-derived haematopoiesis / N. Hole // Cell Tissues Organs. — 1999. — V. 165. — P. 181–189.
8. *Keller G.* Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture / G. Keller, M. Kennedy // Mol. Cell. Biol. — 1993. — V. 13. — P. 473–486.
9. Derivation of completely cell culture derived mice from early-passage embryonic stem cells / A. Nagy, J. Rossant, R. Nagy [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — V. 90. — P. 8424–8428.
10. Directed differentiation of human embryonic stem cells as spin embryoid bodies and a description of the hematopoietic blast colony forming assay / E. S. Ng, R. P. Davis, T. Hatzistavrou [et al.] // Current Protocols in Stem Cell Biology. — 2008. — Ch. 1. — Unit 1D.3.
11. *Odorico J. S.* Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines / J. S. Odorico, D. S. Kaufman, J. A. Thomson // Stem Cells. — 2001. — V. 19. — P. 193–204.
12. *Sakai Y.* Embryoid body culture of mouse embryonic stem cells using microwell and micropatterned chips / Y. Sakai, Y. Yoshiura, K. Nakazawa // J. of Bioscience and Bioengineering. — 2011. — V. 111, № 1. — P. 85–91.
13. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells / M. J. Shamblott, J. Axelman, S. Wang [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — V. 95. — P. 13726–13731.
14. *Stover A. E.* The generation of embryoid bodies from feeder-based or feeder-free human pluripotent stem cell cultures / A. E. Stover, P. H. Schwartz // Methods in Molecular Biology. — 2011. — V. 767, № 6. — P. 391–398.
15. *Trettner S.* Embryoid body formation: recent advances in automated bioreactor technology / S. Trettner, A. Seeliger, N. I. zur Nieden // Methods in Molecular Biology. — 2011. — V. 690. — P. 135–149.
16. *Wobus A.* Potential of embryonic stem cells / A. Wobus // Molecular Aspects of Medicine. — 2001. — V. 22. — P. 149–164.
17. Establishing a dynamic process for the formation, propagation, and differentiation of human embryoid bodies / G. Yirme, M. Amit, I. Laevsky [et al.] // Stem Cells and Development. — 2008. — V. 17, № 6. — P. 1227–1241.

Д.И. Билько, Н.М. Билько

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАННИХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ФОРМИРОВАТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ IN VITRO

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) являются плюрипотентными. Исследованиями последних лет показано, что ЭСК могут дифференцироваться в разные специализированные клетки и моделировать процесс раннего эмбриогенеза. Исследовали ЭСК методом «висящей капли» *in vitro*. Цистоподобные образования, которые получили название «эмбрионидные тельца», формировались в специальных условиях при наличии комплекса ростовых факторов. Проанализировали пути дифференцировки ЭСК в гемопоэтические. Результаты рассматриваются как основание для разработки модели исследования ранних событий, происходящих в эмбриогенезе и поиска путей накопления соматических предшественников и дифференцированных клеток для трансплантации.

Ключевые слова: эмбриональная стволовая клетка, культура *in vitro*, эмбриональные тельца, гемопоэз, трансплантация.

D.I. Bilko, N.M. Bilko

POTENTIAL POSSIBILITY OF EMBRYONIC STEM CELLS TO FORM HEMOPOIETIC CELLS IN VITRO

Embryonic stem cells (ES) are a type of pluripotent cells. Recently ES cells were found to be able to develop into specialized somatic cells and to recapitulate processes of early embryogenesis. The ES cells by the «hanging drop» method *in vitro* culture was investigated. Embryoid bodies (EB) of defined cell numbers have been generated, and morphology of EB-derived cells during hemopoietic differentiation *in vitro* was evaluated. These properties allow the use ES cells as model system for investigation of early embryonic development and for the generation of somatic precursors or differentiated cells for transplantation.

Key words: embryonic stem cell, culture *in vitro*, embryoid bodies, hemopoiesis, transplantation.