

Экспрессия CD34 рецепторов на нативных и культивированных клетках эмбрионального происхождения

Е.И. ГОНЧАРУК, Т.Ф. ПЕТРЕНКО, Н.А. ВОЛКОВА, В.В. ПАРФЕНОВА, Л.А. БАБИЙЧУК, В.И. ГРИШЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Научная лаборатория криочувствительности и криорезистентности биологических объектов при их хранении в тканевом банке при ИПКиК НАНУ, г. Харьков

Проведено изучение наличия антигенных детерминант CD34 на клетках эмбрионального происхождения, полученных из тканей эмбриона и происходящих из них клеточных культурах. Проводили измерения нативного и непосредственно деконсервированного материала, а также материала после отмывки криопротектора.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись 1) суспензии клеток эмбриональной печени и эмбриональных нервных клеток человека 7-12 недель гестации; 2) мезенхимально-мезодермальные клетки (ММК), полученные из тела эмбриона; 3) суспензии клеток хориона (ворсинчатая часть) 9-10 недель гестации; 4) первичные культуры и перевиваемые диплоидные линии клеток мезенхимально-мезодермального происхождения, эмбриональной печени, а также хориона. Были исследованы как нативные, так и криоконсервированные суспензии клеток, полученные из тканей и клеточные культуры. Суспензии и культуры клеток получали и криоконсервировали по стандартным методикам [1, 2].

Исследования проводили на проточном цитофлюориметре FACS Calibur фирмы Becton-Dickinson (США) с использованием реагентов Becton-Dickinson. В нашем распоряжении были моноклональные антитела CD34-PE (клон 8G12, anti-НРСА-2)/CD45-FITC (клон 2D1). Использовался стандартный ISHAGE протокол анализа результатов.

Результаты и обсуждение

На первом этапе были исследованы нативные и криоконсервированные суспензии клеток, полученные из эмбриональных тканей.

Криоконсервирование, а также последующая отмывка от криопротектора перед измерением не оказывала влияния на содержание CD34⁺-клеток. Как следует из таблицы, наиболее привлекательными по содержанию стволовых клеток-предшественников являются мезенхимально-мезодермальные клетки. Эти объекты были использованы для дальнейшего культивирования в виде монослойной

культуры. Пилотное исследование культивированных клеток в пассажах показало наличие незначительного количества CD34-несущих клеток. Следует отметить большой процент неспецифического свечения клеток культур, вероятно связанных с образованием конгломератов.

На рисунке представлена экспрессия CD34 рецепторов на клетках ММК. Количество жизнеспособных клеток, определенное по маркеру 7AAD в нативной суспензии мезенхимально-мезодермальных клеток составляло 87,2±2,2%. В суспензии клеток после криоконсервирования выявлено 72,2±1,8 % жизнеспособных клеток. Содержание CD34⁺-клеток в данном препарате составляло 46,2±1,4 и не изменялось после криоконсервирования.

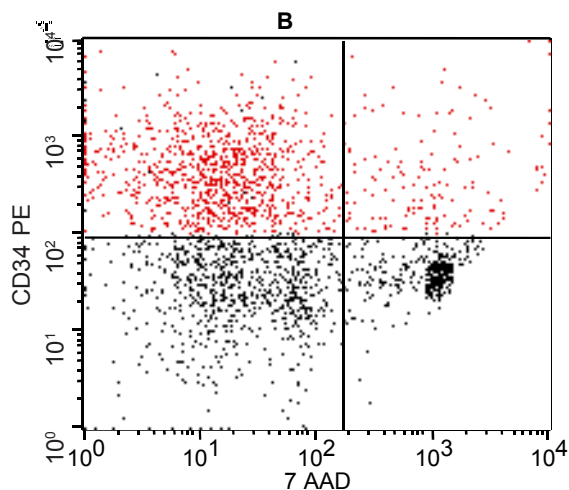
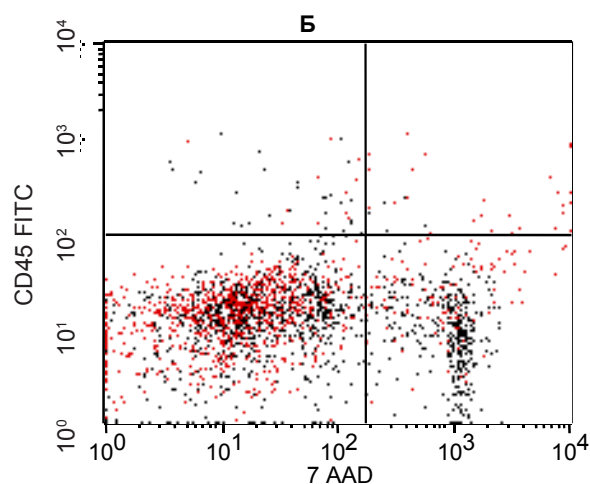
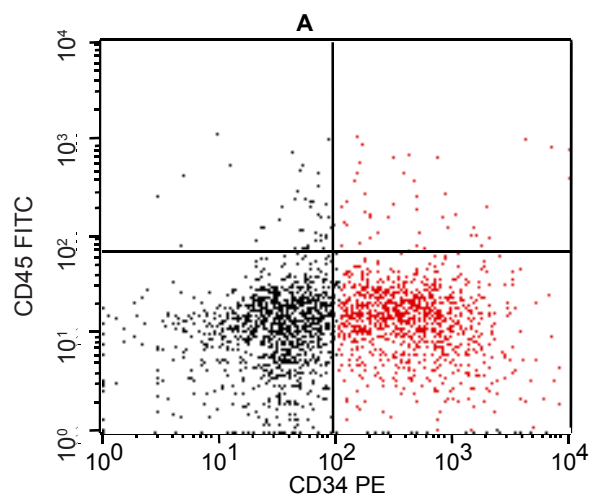
Обращает на себя внимание значительный процент CD34⁺CD45⁺-клеток среди ММК. Учитывая возможную аутофлюоресценцию изучаемых клеток, мы исследовали неспецифическое свечение к флуорохромам PE и FITC в образцах. Полученные результаты показали наличие аутофлюоресценции около 1-2%. Таким образом, неспецифического свечения в значимых пределах выявлено не было.

Интересным для объяснения представляется вопрос о массовой экспрессии на ММК антигена CD34 класса II, (клон 8G12), который был использован в нашей работе. Известно, что для семейства CD34 в настоящее время идентифицировано три класса антигенов и соответствующих им моноклональных антител, распознающих три разных эпитопа. Из них на эмбриональных фибробластах экспрессируются только эпитопа CD34 класса III. Поэтому интересным представ-

Содержание CD34⁺-клеток в эмбриональных препаратах

Исследованный препарат, суспензии клеток	Суммарное содержание CD34 ⁺ несущих клеток, %
Мезенхимально — мезодерма — льные клетки	46,9±2,2
Гемоклетки	5,13±0,8
Хорион	3,63±0,7
Нейроклетки	0,68±0,2

Адрес для корреспонденции: Гончарук Е.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua



Экспрессия CD34 рецепторов на криоконсервированных клетках ММК: А – экспрессия CD34 и CD 45 на ММК; В – жизнеспособность CD45⁺-клеток; С – жизнеспособность CD34⁺-клеток.

ляется, что на исследуемых клетках выявлено наличие антигена CD34 класса II. По данным фирмы-производителя BD, этот класс стандартно экспрессирован на незрелых гемопоэтических клетках-предшественниках и всех гемопоэтических колониобразующих клетках костного мозга и крови, включая как унипотентные (CFU-GM, BFU-E), так и плюрипотентные (CFU-GEMM, CFU-Mix, CFU-Blast) предшественники. Наличие его рецепторов на ММК может свидетельствовать либо о перекрестном реагировании эпитопов между собой, либо о том, что данные клетки имеют широкий потенциал дифференцировки.

Литература

1. *Культура животных клеток. Методы* / Под ред. Р. Фрешни.– М.: Мир, 1989.– 333 с.
2. *Грищенко В.И., Лобынцева Г.С. и др. Клиническое применение криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека. Метод. рекомендации.*– Киев, 1991.– 9 с.