

СРАВНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РАННИХ МАРКЕРОВ В ПУПОВИННОЙ КРОВИ И ЗАГОТОВКАХ МОБИЛИЗОВАННОЙ КРОВИ

© А. В. Пантелейев,¹ И. А. Воробьев^{1–3}

¹ Гематологический научный центр Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Москва,

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

и ³ Кафедра клеточной биологии и гистологии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;
электронный адрес: panteleev@yandex.ru, ivorobjev@mail.ru

Основными источниками кроветворных клеток-предшественников, экспрессирующих ранние антигены у человека, являются так называемая мобилизованная кровь, получаемая при стимуляции кроветворения с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, и пуповинная кровь. В настоящей работе методом многоцветной проточной флуориметрии проведена оценка содержания клеток-предшественников, основанная на экспрессии маркеров CD34, CD133, CD90, CDCP1 и CD117, а также активационного маркера CD38. Показано, что клетки, положительные по каждому маркеру, выделяются в виде отдельной популяции. Содержание клеток, положительных по каждому отдельному маркеру, в мобилизованной крови в 2 раза и более превышает их содержание в пуповинной, однако содержание клеток с комплексными фенотипами, соответствующими ранним предшественникам кроветворения ($CD34^+/CD38^-/CD117^-$, $CD133^+/CD34^+/CD38^-$, $CDCP1^+/CD34^+/CD38^-$ и пр.), в мобилизованной и пуповинной крови сходно. Существует достоверная положительная корреляция в экспрессии антигенов CD34, CD133, CDCP1 и CD117 клетками пуповинной и мобилизованной крови. Для антигена CD90 существует корреляция с CD34, CD133, CD117 и CDCP1 только в пробах пуповинной крови. Анализ коэкспрессии данных антигенов и активационного маркера CD38 показал, что гипотеза об их последовательном включении и выключении в ходе дифференцировки кроветворных клеток не подтверждается. Мы полагаем, что существует общая регуляция экспрессии CD34, CD133, CDCP1 и CD117, экспрессия CD38 может обратимо выключаться на дифференцирующихся кроветворных клетках, а экспрессия CD117 возникает не только на клетках, коммитированных в сторону миелопоэза.

Ключевые слова: проточная цитометрия, стволовые клетки, CD34, CD133, CD117, CDCP1, пуповинная кровь, мобилизованная кровь.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, СКК — стволовые клетки крови, AlexaFL750 — Alexa Fluor 750, APC — аллофикационин, FITC — флуоресцеинизотиоцианат, LIN⁻ — линейно-негативные клетки, PBS — фосфатно-солевой буфер, РЕ — фикоэрритрин, PerCP-Сy5.5 — tandemный краситель перидин хлорофилл белок, конъюгированный с цианиновым красителем 5.5, 7-AAD — 7-аминоактиномицин Д.

При лечении ряда заболеваний применяется трансплантация стволовых гемопоэтических клеток. Стволовые клетки крови (СКК) способны к неограниченному самовоспроизведению, нечувствительны к ростовым факторам и способны дифференцироваться в тканеспецифичных потомков (Bonnet, 2002; Kondo et al., 2003; Bellantuono, 2004). Они малочисленны, морфологически не отличаются от дифференцированных клеток крови и преимущественно находятся в фазе G₀/G₁ клеточного цикла (Воробьев и др., 1985; Gothot et al., 1997). Для подсчета стволовых клеток при их заготовке используются моноклональные антитела против панлейкоцитарного антигена CD45 и маркера ранних клеток-предшественников CD34. В настоящее время получены антитела против ряда других антигенов, которые экспрессируются преимущественно на клетках-предшественниках гемопоэти-

ческого ряда: CD133, CDCP1 и CD90. Показано, что гемопоэтические клетки, экспрессирующие эти антигены, способны восстанавливать мультилинейное кроветворение у имунодефицитных мышей (Yin et al., 1997; De Wytter et al., 1998; Kondo et al., 2003; Bühring et al., 2004). Кроме того, СКК и клетки-предшественники не экспрессируют антигены зрелых, линейно дифференцированных клеток крови (линейно-негативные), такие как CD3, CD19, CD14, CD56, CD66, CD2 и GlyA (Bhatia et al., 1998; Forraz et al., 2004), что позволяет выделять СКК с помощью клеточного сортера.

Антиген CD34 — общепризнанный маркер СКК человека (Brandt et al., 1990). Количество CD34-положительных клеток в нормальном костном мозге может составлять до 4 % (Benedetti, 1996). В качестве основного фенотипа СКК человека рассматривается комбинация

CD45^{low}/CD34⁺/CD38⁻ (Kondo et al., 2003). Кроме того, стволовые клетки положительны по антигенам Thy-1 (CD90) и CD49f и сравнительно быстро выводят родамин 123 (Notta et al., 2011). Впрочем, негативная окраска на CD38 имеет относительный характер — популяции CD34⁺/CD38⁻ не выделяются в виде отдельных пиков на гистограммах (Notta et al., 2011).

В группе CD34⁺ присутствуют клетки с различным дифференцировочным потенциалом: часть способна только к ограниченной пролиферации, другие могут образовывать колонии с несколькими типами дифференцировок (Perey et al., 1998; Dykstra et al., 2007). Некоторые из CD34-положительных клеток экспрессируют ранние антигены CD133, CDCP1, CD90 и маркеры дифференцировки CD117 и CD38 (De Bruyn et al., 1995; De Wynter et al., 1998; Buhring et al., 1999, 2004; Haeryfar, Hoskin, 2004). Из всех CD34⁺-клеток костного мозга только около 1—5 % не экспрессирует CD38 (Nimgaonkar et al., 1995; D’Arena et al., 1996). В пуповинной крови количество клеток CD34⁺/CD38⁻ больше, чем в нормальном костном мозге, и составляет до 16 % от всех CD34-положительных клеток (D’Arena et al., 1996).

В то же время известно, что самые ранние кроветворные клетки могут быть CD34-негативными (Bhatia et al., 1998). Так, клетки с фенотипом CD34-/CD133⁺, выделенные из пуповинной крови, обладают свойствами СКК (Gallacher et al., 2000; Rutella et al., 2003). Экспрессия антигена CD133 показана в популяции CD34-положительных клеток гемоэтических предшественников (Yin et al., 1997). CD34-/CD133⁺ могут начинать экспрессировать CD34 при культивировании *in vitro* (Zanjani et al., 1998). CD34-/CD133⁺-клетки пуповинной крови, вероятно, представляют собой более ранние предшественники, чем CD34⁺/CD133⁺ (Giebel, Punzel, 2008). В популяции клеток CD34⁺/CD38⁻ выявляется экспрессия антигенов CD133 и CDCP1. Профиль экспрессии CDCP1 схож с CD133, однако неидентичен: 99 % CDCP1-положительных клеток экспрессировали также CD34 и 81 % — CD133. Выявлена группа клеток с фенотипом CDCP1⁺/CD34⁻/CD133⁻ (Buhring et al., 2004).

Особый интерес представляет экспрессия CD117. В костном мозге человека выявляется 2—5 % нормальных клеток, экспрессирующих CD117, причем значительная часть этих клеток коэкспрессирует CD34 — не менее половины (Sperling et al., 1997), по другим данным — 20 % (Sakabe et al., 1997). Предполагается, что CD117 в ходе нормального гемопоэза может экспрессироваться на самых ранних стадиях дифференцировки Т- и В-клеток. В дальнейшем его экспрессия сохраняется только при созревании миелоидных ростков кроветворения, и ее уровень постепенно снижается (Sperling et al., 1997). Однако другие данные указывают на то, что экспрессия CD117 позволяет разделить миелоидные и лимфоидные клетки-предшественники (Escribano et al., 1998). В клетках нормальной периферической крови CD117 не экспрессируется (Gadd, Ashman, 1985). При острых лейкозах CD117 рассматривается как миелоидный маркер, поскольку он крайне редко встречается при лимфобластных вариантах острого лейкоза (Sperling et al., 1997).

Было высказано предположение о том, что фенотип стволовых клеток пластичен и может изменяться, отражая различные стадии активации кроветворных клеток (Donnelly, Krause, 2001). Эта гипотеза в принципе ставит под сомнение возможность идентификации стволовых клеток по иммунофенотипу. Однако существующая в на-

стоящее время успешная практика трансплантации CD34-положительных клеток пациентам позволяет предположить, что эта популяция содержит достаточное количество стволовых клеток.

Источниками стволовых клеток и клеток-предшественников выступают костный мозг, пуповинная кровь и продукты лейкоцитареза больных, проходивших стимуляцию кроветворения гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (ГКСФ) (Kurtzberg et al., 1996; De Bruyn et al., 2000; Wang et al., 2009). Пуповинная кровь — это доступный материал, содержащий ранние гемоэтические клетки. Считается, что пуповинная кровь содержит клетки ранних предшественников кроветворения в большей концентрации, чем нормальный костный мозг взрослых людей (Timeus et al., 1998), однако детальная характеристика иммунофенотипа кроветворных клеток в пуповинной крови не проводилась.

Целью настоящей работы стало сравнение содержания ранних клеток-предшественников в образцах пуповинной крови и мобилизованной периферической крови, что позволит более точно оценить возможности иммунофенотипического определения этих клеток.

Материал и методика

Периферическая кровь, мобилизованная ГКСФ, была получена у пациентов, проходивших лечение в ГНЦ РАМН, 6 ГКБ и РОНЦ им. А. С. Блохина. Время хранения материала до начала работы не превышало 12 ч. Образцы мобилизованной крови были получены от пациентов с различными онкогематологическими заболеваниями. Замороженные образцы пуповинной крови были получены от родивших женщин, не болевших гематологическими заболеваниями (Банк стволовых клеток). Образцы пуповинной крови размораживали в теплой проточной воде при 37 °C и сразу же проводили пробоподготовку. Для каждой размороженной пробы учитывали содержание живых клеток с помощью красителя 7-аминоактиномицина Д (7-AAD). Объем вносимого материала брали из расчета не менее 10⁶ клеток в каждую пробу. Эритроциты лизировали добавлением 8.3 % хлорида аммония. Оставшиеся клетки отмывали PBS, содержащим 1 % БСА. Клетки инкубировали 30 мин при 4 °C с мышьями антителами к человеческим антигенам; продолжительность окраски для выявления CD133 — 10 мин.

В контрольных экспериментах использовали мышьные антитела к IgG1, конъюгированные с FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC и Alexa-FL750.

В работе были использованы антитела: CD34 FITC (clone 8g12, BD Bioscience, США), CD34 PE (BD Bioscience, США), CD133 PE (clone CD133/2 PE, Miltenyi Biotec, Германия), CD117 PE (clone 104D2, Dako, Дания), CDCP1 PE (anti-hCDCP1 PE, R&D Systems, США), CD90 FITC (Thy-1, eBioscience, США), CD38 FITC (clone HIT2, eBioscience, США), LIN- (CD3+CD19+CD56+CD14+ FITC, Exalpha, США), CD34 PerCP-Cy5.5 (clone 8g12, BD Bioscience, США), CD117 APC (BD Bioscience, США), CD45 Alexa-FL750 (Invitrogen, США), GlyA FITC (clone JC159, Dako, Дания) и CD66b FITC (clone G10F5, Biolegend, США).

Исследование проводили в два этапа. На первом этапе — двух- и трехцветные пробы, на втором — пятицвет-

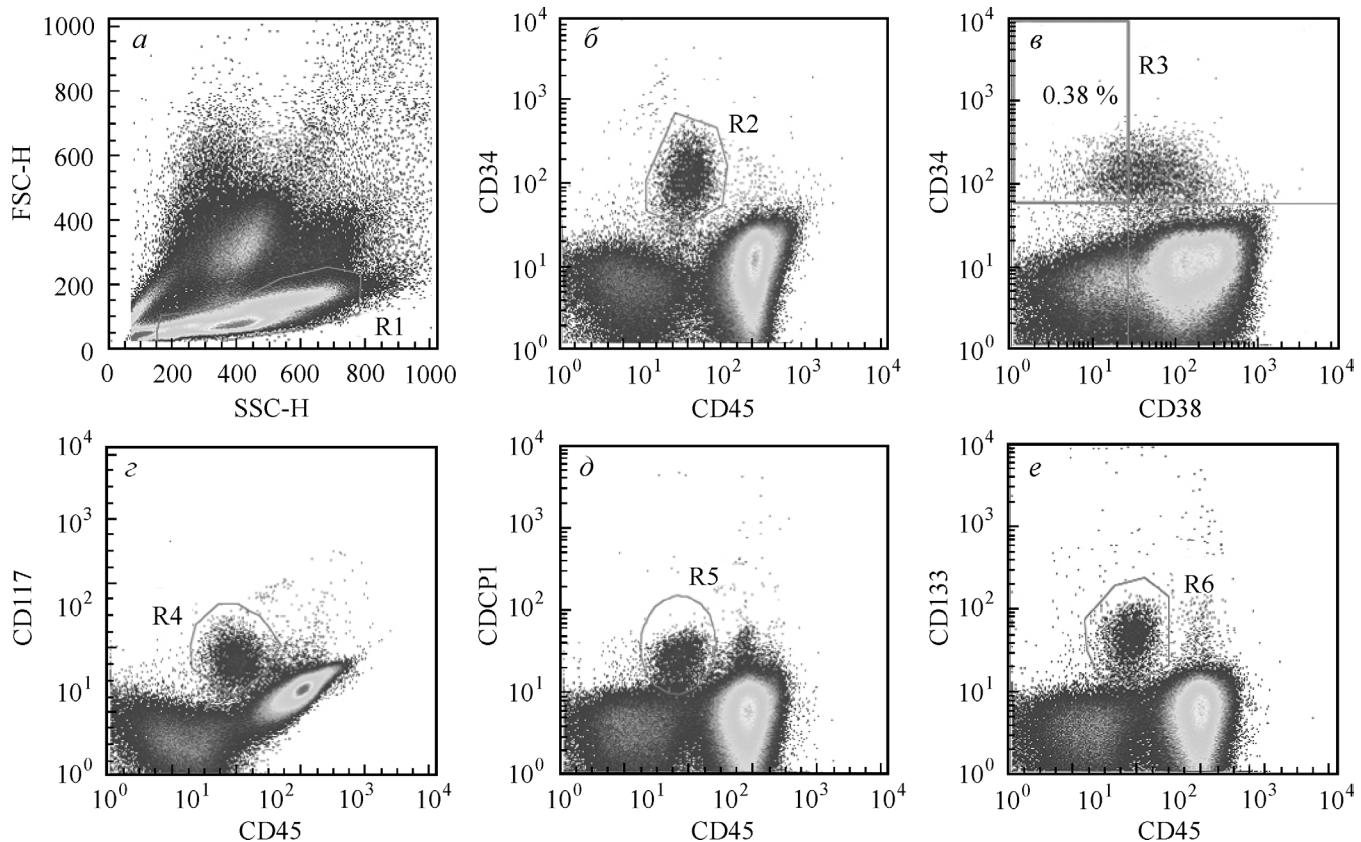


Рис. 1. Экспрессия ранних антигенов в пробе пуповинной крови.

a — клетки пуповинной крови гейтированы в лимфоцитарно-моноцитарном регионе R1; *б* — популяция CD34⁺-положительных клеток (область R2); *в* — клетки CD34⁺/CD38⁻ не выявляются в виде отдельной популяции (область R3); *г* — популяция CD117⁺-положительных клеток (область R4); *д* — популяция CDCP1⁺-положительных клеток (область R5); *е* — популяция CD133⁺-положительных клеток (область R6).

ные. В первую группу вошло 28 проб мобилизованной крови пациентов и 38 образцов пуповинной крови от 38 здоровых женщин. Во вторую группу вошло 15 образцов мобилизованной крови и 18 образцов пуповинной крови. Все пробы пуповинной и мобилизованной крови получены от разных людей.

Двух- и трехцветная панель: CD38/CD34/CD90; CD34/CD133/CD45; CD34/CD117/CD45; CD90FITC/CD34; CD34/CDCP1/CD45; CD3+CD19+CD56+CD14+GlyA+ +CD66b/CD38/CD34. Пятицветная панель: CD38/CD133/CD34/CD117/CD45; CD38/CDCP1/CD34/CD117/CD45; CD3+CD19+CD56+CD14+GlyA+CD66b/CD38/CD34/CD117/CD45.

Двух- и трехцветные пробы анализировали с использованием проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD Bioscience, США) и программы CellQuest, пятицветную — с помощью проточного цитофлуориметра FACS-Canto II (BD Bioscience, США) и программы BD FACSDiva. При подсчете собирали $5 \cdot 10^5$ — $5 \cdot 10^6$ клеток. Результаты экспорттировали в файлы формата FSC 2.0 или FSC 3.0, компенсировали и анализировали с использованием программы FlowJo (TreeStar, США). Доля клеток лимфоцитарно-моноцитарного полигона была принята за 100 %. Статистический анализ проводили с помощью программ STATISTICA 6 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, США). Данные приведены в виде медиана \pm стандартная ошибка, статистическая значимость рассчитана по критерию Манна—Уитни при $P < 0.01$ (если не указано иного).

Результаты

На рис. 1 в качестве примера приведены графические результаты проточной цитофлуориметрии клеток образца пуповинной крови человека, тестируемых по наличию парных антигенов. Клетки, положительные по экспрессии CD34, CD117, CDCP1 и CD133, выделяются в виде отдельных популяций (рис. 1, *б*, *г*—*е*). Анализ клеток по двум маркерам одновременно показал, что группы CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/CD117⁺, CD34⁺/CD117⁻, CDCP1⁺/CD117⁺ и CD34⁺/CDCP1⁺ также представляют собой отдельные популяции. Определение количества клеток CD34⁺/CD38⁻ производили с помощью отсечек, установленных по негативному контролю (рис. 1, *в*), поскольку группа не образовывала отдельную популяцию.

Одно- и двухпараметрическое сравнение пуповинной и мобилизованной крови. Содержание клеток, экспрессирующих каждый из ранних антигенов, в мобилизованной крови выше, чем в пробах пуповинной крови, не менее чем в 2 раза (табл. 1). Уровни экспрессии CD133, CDCP1, CD34 и CD117 коррелируют друг с другом в пробах пуповинной и мобилизованной крови с высоким коэффициентом (табл. 2, 3).

Большинство клеток, экспрессирующих CD34, не несут антигенов линейно-коммитированных клеток (80—89 % всех клеток CD34⁺ являются линейно-негативными), но только 15—22 % CD34-положительных клеток не несут маркер CD117 (табл. 4). В мобилизованной крови клеток с фенотипами CD34⁺/CD117⁻ и

CD34⁺/LIN⁻ больше, чем в пуповинной. Количество клеток CD34⁺/LIN⁻ оказалось значительно больше, чем CD34⁺/CD117⁻.

Количество клеток с фенотипом CD34⁺/CD38⁻ в пробах мобилизованной крови ниже, чем в пуповинной (табл. 4). Значительная часть клеток CD34⁺/CD38⁻ экспрессирует миелоидный антиген CD117, а часть клеток несет линейно-специфические антигены зрелых клеток. Мы не обнаружили клеток с низким уровнем экспрессии CD117, описываемых в ранних работах (Kawashima et al., 1996), которые было бы возможно выделить в отдельную популяцию. Содержание клеток с фенотипами CD34⁺/CD38⁻/CD117⁺, CD34⁺/CD38⁻/CDCP1⁺ и CD34⁺/CD38⁻/CD133⁺ в пуповинной и мобилизованной крови сходно (табл. 4). Клетки пуповинной крови CD34⁺/CD38⁻ обогащены экспрессией CD117 по сравнению с мобилизованной. В пуповинной крови доля CD38-отрицательных событий от всех CD133⁺/CD34⁺, CD34⁺/CDCP1⁺ и CD34⁺/CD117⁻ значимо больше, чем в мобилизованной. Доли клеток CDCP1⁺ и CD133⁺ среди CD34⁺/CD38⁻ в мобилизованной и пуповинной крови сходны и составляют около 60 %. Содержание CD34⁺/CD38⁻/LIN⁻ в пробах пуповинной и мобилизованной крови сходно, как и клеток CD34⁺/CD38⁻/LIN⁻/CD117⁻ (табл. 4). Таким образом, с учетом трех маркеров и более (CD34⁺/CD38⁻/CD133⁺, CD34⁺/CD38⁻/CDCP1⁺, CD34⁺/CD38⁻/CD117⁻ и CD34⁺/CD38⁻/LIN⁻) количество

Таблица 1
Содержание клеток в пробах мобилизованной и пуповинной крови, экспрессирующих исследуемые антигены

Антиген	Пуповинная кровь (% клеток от всех событий) (n = 56)	Мобилизованная кровь (% клеток от всех событий) (n = 43)
CD34 ⁺	1.36 ± 0.09	4.00 ± 0.67
CD133 ⁺	1.21 ± 0.10	3.22 ± 0.61
CD117 ⁺	2.01 ± 0.13	4.49 ± 0.71
CD90 ⁺	0.10 ± 0.05 (n = 31)	0.27 ± 0.16 (n = 26)
CDCP1 ⁺	1.53 ± 0.14	4.26 ± 0.68

клеток, соответствующих ранним клеткам-предшественникам, в пуповинной и мобилизованной крови сходно.

Содержание CD34-негативных клеточных популяций, экспрессирующих ранние линейно-неспецифичные маркеры CD133 и CDCP1. В пробах пуповинной и мобилизованной крови содержание клеток CD34-/CD133⁺ значимо не различается ($P = 0.48$). Значительная часть клеток CD34-/CD133⁺ (70—80 %) экспрессирует CD38, что противоречит предположению об их ранней природе. Клеток с фенотипом CD133⁺/CD34-/CD38⁻ в пуповинной крови содержит-

Таблица 2
Коэффициенты корреляции Спирмена для антигенов CD34, CD133, CD117, CD90 и CDCP1 в пробах мобилизованной крови

Антиген	Коэффициент корреляции Спирмена для пар антигенов			
	CD133	CD117	CD90	CDCP1
CD34	0.95 (n = 43) ^a	0.93 (n = 43) ^a	0.17 (n = 26)	0.96 (n = 43) ^a
CD133		0.97 (n = 43) ^a	0.14 (n = 26)	0.97 (n = 43) ^a
CD117			0.18 (n = 26)	0.97 (n = 43) ^a
CD90				0.13 (n = 26)

Примечание. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена определили между количеством клеток, экспрессирующих каждый из антигенов, попарно. ^a — Наличие достоверной корреляции.

Таблица 3
Коэффициенты корреляции Спирмена для антигенов CD34, CD133, CD117, CD90 и CDCP1 в пробах пуповинной крови

Антиген	Коэффициент корреляции Спирмена для пар антигенов			
	CD133	CD117	CD90	CDCP1
CD34	0.93 (n = 56) ^a	0.79 (n = 56) ^a	0.61 (n = 31) ^a	0.89 (n = 56) ^a
CD133		0.82 (n = 56) ^a	0.74 (n = 31) ^a	0.86 (n = 56) ^a
CD117			0.65 (n = 31) ^a	0.80 (n = 56) ^a
CD90				0.66 (n = 31) ^a

Примечание. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена определили между количеством клеток, экспрессирующих каждый из антигенов, попарно. ^a — Наличие достоверной корреляции.

Таблица 4

Содержание CD34-положительных клеток в пробах мобилизованной и пуповинной крови, экспрессирующих ранние антигены

Антиген (сочетание антигенов)	Пуповинная кровь (% клеток от всех событий) (n = 56)	Мобилизованная кровь (% клеток от всех событий) (n = 43)
CD34 ⁺ /CD117 ^{-a}	0.28 ± 0.02	0.49 ± 0.15
CD34 ⁺ /LIN ⁻	1.02 ± 0.17 (n = 53)	3.41 ± 0.66
CD34 ⁺ /CD38 ⁻	0.32 ± 0.03	0.20 ± 0.05
CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD117 ⁻	0.10 ± 0.010 (n = 15)	0.13 ± 0.06 (n = 15)
CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /LIN ⁻	0.26 ± 0.03 (n = 15)	0.18 ± 0.07 (n = 15)
CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /LIN ⁻ /CD117 ⁻	0.07 ± 0.01 (n = 15)	0.07 ± 0.03 (n = 15)
CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD133 ⁺	0.175 ± 0.043	0.15 ± 0.07
CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CDCP1 ⁺	0.20 ± 0.04	0.14 ± 0.068

Примечание. ^a Среди клеток CD34⁺ и CD34⁺/CD38⁻ для последующего детального анализа были выбраны группы с маркерами CD133⁺, CDCP1⁺, CD117⁻ и LIN⁻; предполагается, что данные фенотипы характеризуют более ранние клетки-предшественники.

ся достоверно больше, чем в мобилизованной (табл. 5, P = 0.0082).

Маркер CDCP1 во многом аналогичен CD133 и также присутствует на части CD34-негативных клеток. В мобилизованной и пуповинной крови содержание клеток с фенотипом CD34-/CDCP1⁺ сходно (табл. 5, P = 0.50). В пуповинной крови доля клеток CD34⁻ относительно всех CDCP1⁺ значительно больше, чем в мобилизованной (P < 0.0001). В пуповинной крови определяется 0.26 ± 0.02 % клеток с фенотипом CD34-/CD38-/CDCP1⁺. В мобилизованной крови их достоверно меньше (менее 0.1 %, P < 0.0001). В пробах пуповинной крови содержание клеток CD34-/CD38-/CD133⁺ значительно ниже (табл. 5, P < 0.0001), чем CD34-/CD38-/CDCP1⁺, что позволяет предположить отличия в экспрессии антигенов CD133 и CDCP1, считающихся гомологичными. В пробах мобилизованной крови содержание клеток CD34-/CD38-/CD133⁺ и CD34-/CD38-/CDCP1⁺ составляет менее 0.1 %, сравнение их количества затруднительно.

Большинство клеток с фенотипами CD34-/CD38-/CD133⁺ и CD34-/CD38-/CDCP1⁺ не экспрессирует CD117: в мобилизованной крови таких клеток 95.83 ± 4.57 и 94.59 ± 1.33 %, а в пуповинной — 78.21 ± 5.28 и 87.87 ±

± 2.45 % соответственно. Это может указывать на ранний характер данных клеток.

Таким образом, пуповинная кровь обогащена по сравнению с мобилизованной кровью CD34-негативными клетками, экспрессирующими ранние антигены CDCP1⁺ и CD133⁺, в том числе в регионах CDCP1^{+/CD38-} и CD133^{+/CD38-}.

Обсуждение

Пуповинная и мобилизованная кровь обладает гетерогенным клеточным составом, представленным СКК, их коммитированными потомками и линейно дифференцированными клетками. Многие уровни созревания кроветворных клеток характеризуются определенным иммунофенотипом (Ройт и др., 2001; Чертов и др., 2006), и в данной работе мы провели анализ фенотипа ранних гемопоэтических предшественников.

Для каждого из антигенов CD34, CD133, CDCP1 и CD117 оказалось возможным выделить отдельную популяцию положительных клеток. Уровень экспрессии каждого антигена в мобилизованной крови был значительно

Таблица 5

Содержание CD34-негативных групп клеток в пробах мобилизованной и пуповинной крови, экспрессирующих ранние антигены

Антиген (сочетание антигенов)	Пуповинная кровь (% клеток от всех событий) (n = 18)	Мобилизованная кровь (% клеток от всех событий) (n = 15)
CD34 ⁻ /CD137 ⁺ ^a	0.33 ± 0.04 (n = 56)	0.26 ± 0.06 (n = 43)
CD34 ⁻ /CDCP1 ⁺	0.68 ± 0.07 (n = 56)	0.80 ± 0.09 (n = 43)
CD34 ⁻ /CD38 ⁻ /CD133 ⁺	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01
CD34 ⁻ /CD38 ⁻ /CDCP1 ⁺	0.26 ± 0.02	0.05 ± 0.01
CD34 ⁻ /CD38 ⁻ /CD117 ⁻ /CD133 ⁺	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
CD34 ⁻ /CD38 ⁻ /CD117 ⁻ /CDCP1 ⁺	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01

Примечание. ^a Среди клеток CD34⁻ и CD34⁻/CD38⁻ для последующего детального анализа были выбраны группы с фенотипами CD133^{+/CD117-} и CDCP1^{+/CD117-}, поскольку предполагается, что данные фенотипы характеризуют более ранние клетки-предшественники.

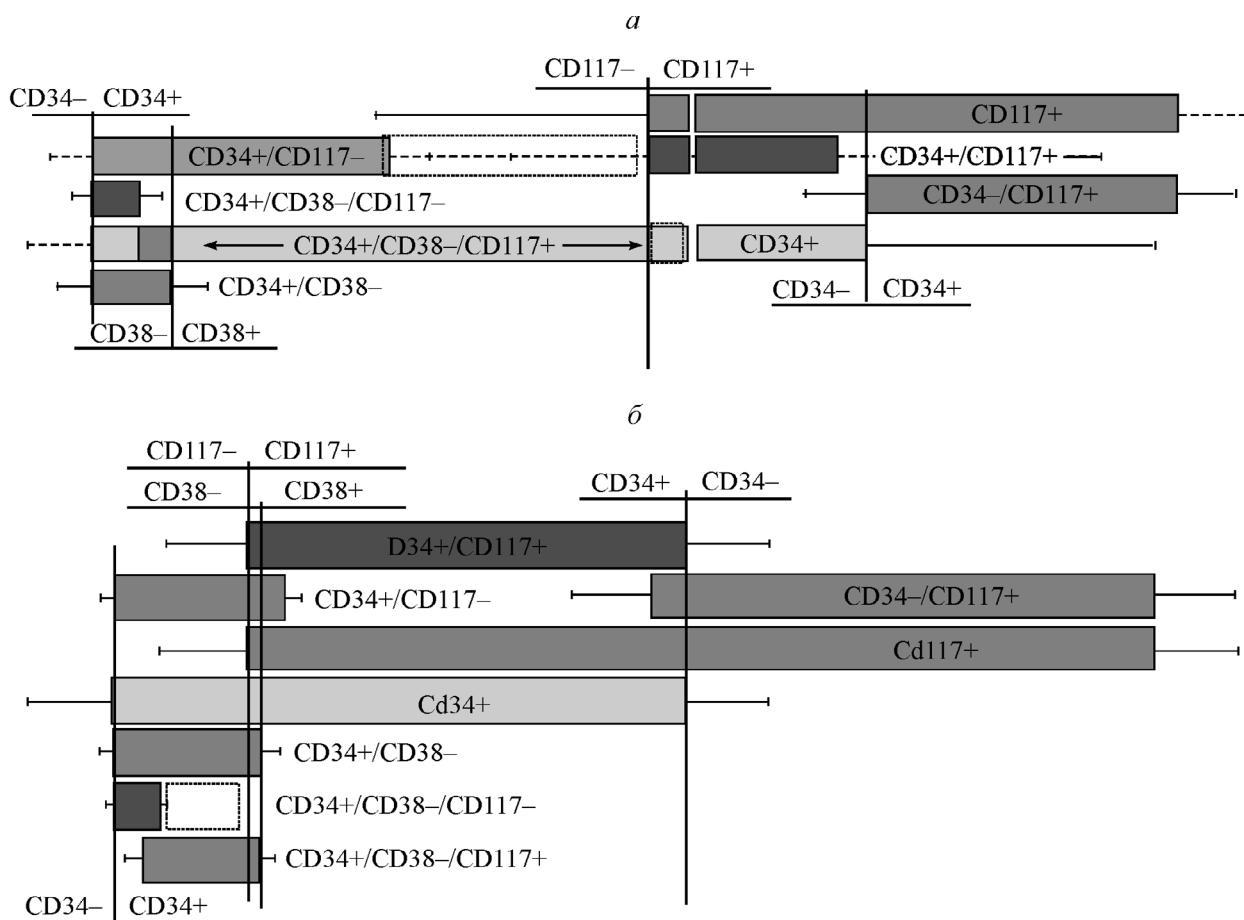


Рис. 2. Экспрессия ранних антигенов на клетках мобилизованной (а) и пуповинной (б) крови. Сопоставление экспериментальных данных с гипотезой линейного созревания.

По вертикали — популяции, представляющие интерес; *по горизонтали* — шкала созревания клеток во времени: длина сегмента соответствует процентному содержанию популяции с указанными фенотипами в лимфоцитарно-моноцитарном регионе; самые ранние группы расположены левее, более дифференцированные — правее. Расположение групп выбрано в соответствии с данными литературы. Длина окрашенных блоков — медиана доли клеток, экспрессирующих антиген(ы); горизонтальные отрезки — стандартная ошибка среднего; блоки, обозначенные штриховой линией — предполагаемое положение клеток на схеме или их ожидаемое количество. В пробе мобилизованной крови (а) измеренное содержание клеток CD34+/CD117⁺ меньше ожидаемого. В пробе пуповинной крови (б) группы клеток CD34+/CD117⁻, CD34+/CD117⁺, CD34+/CD117⁺, CD34 и CD117 на схеме накладываются друг на друга, нарушая линейную гипотезу. Положение клеток CD34+/CD38-/CD117⁺ двойственны: клетки могут начать экспрессировать CD117, не приобретая экспрессию CD38, или, наоборот, клетки CD34+/CD117⁺ могут потерять экспрессию CD38 (а, б).

выше, чем в пуповинной. Это может указывать на значительное обогащение мобилизованной крови клетками-предшественниками в ответ на стимуляцию ГКСФ. Выделяются группы, коэкспрессирующие два антигена, что согласуется с данными литературы (Bühring et al., 1999, 2004; Haegyfar, Hoskin, 2004).

Доля ранних антигенов (CDCP1⁺ и CD133⁺) среди клеток CD34⁺/CD38⁻ в двух группах сходна. Выделяемые по комбинации из трех и четырех антигенов группы клеток показывают больше сходства, чем при сравнении по экспрессии одного антигена или коэкспрессии двух. В пробах пуповинной и мобилизованной крови выявляется большее количество клеток CD34-/CDCP1⁺, чем CD34-/CD133⁺. В пуповинной крови содержится существенно меньше клеток CD34-/CD38-/CD133⁺, чем CD34-/CD38-/CDCP1⁺. В совокупности это позволяет предположить более раннее начало экспрессии CDCP1 по сравнению с CD133. Косвенно подтверждает это описание группы клеток с фенотипом CDCP1⁺/CD34-/CD133⁺ (Bühring et al., 2004). Для клеток с фенотипами CD34-/CD38-/CD133⁺ и CD34-/CD38-/CDCP1⁺ характерно отсутствие экспрессии CD117, что является указанием на

их ранний уровень дифференцировки. Очень низкое содержание клеток с фенотипами CD34-/CD38-/CDCP1⁺ и CD34-/CD38-/CD133⁺ в пробах мобилизованной крови может указывать на то, что стимуляция ГКСФ индуцирует к выходу в кровь более зрелые клетки.

Мы впервые показали существование высокого уровня корреляции между количеством клеток, экспрессирующих антигены CD34, CD133, CD117 и CDCP1 в пробах пуповинной и мобилизованной крови. Поскольку одновременная экспрессия антигенов наблюдается на крайне малом количестве клеток, высокий уровень корреляции позволяет высказать предположения, во-первых, о существовании общей регуляции экспрессии всех ранних гемопоэтических маркеров, во-вторых, о последовательном появлении и исчезновении экспрессии ранних антигенов на гемопоэтических клетках в определенной последовательности.

Гипотеза о закономерном включении и выключении экспрессии ранних маркеров в процессе дифференцировки СКК широко распространена. На этом основании была предложена схема линейной экспрессии (McGuckin et al., 2003). Исходя из этой гипотезы доля клеток в пробе, экс-

пресирирующих антиген, характеризует продолжительность его экспрессии, доля клеток, одновременно экспрессирующих два антигена, характеризует продолжительность соответствующей стадии дифференцировки. В настоящее время предполагается, что наиболее ранние гемопоэтические клетки, экспрессирующие CD45, могут обладать фенотипом CD34-/CD133-/CD38-/CD117-/LIN-/CDCP1⁺ (Bühring et al., 2004). По мере дифференцировки этих клеток появляются последовательно CD133, CD34 и CD38.

Наша схема и данные литературы не дают ответа на вопрос о том, что исчезает раньше — CD133 или CDCP1. Маркеры продолжают экспрессироваться на линейно-коммитированных клетках миелоидной направленности в равной степени (клетки CDCP1^{+/CD117⁺ и CD133^{+/CD117⁺ встречаются в сходном количестве). В схеме после исчезновения экспрессии CDCP1 и CD133 на клетках продолжает сохраняться экспрессия CD34 и CD117. В дальнейшем исчезает экспрессия CD34, а в заключение и CD117. Количество клеток CDCP1^{+/CD117⁺ и CD133^{+/CD117⁺ меньше, чем CD34^{+/CD117⁺, что согласуется с предлагаемой схемой. Наши результаты для первых трех антигенов укладываются в линейную схему как для пуповинной крови, так и для мобилизованной. Трудности возникают в отношении маркеров CD38 и CD117, если предполагать, что они включаются на определенном уровне дифференцировки клеток, и при детальном рассмотрении коэкспрессии с другими маркерами (рис. 2, а, б). Возникает наложение групп клеток CD34^{+/CD117⁻, CD34^{+/CD117⁺, CD34⁺ и CD117⁺ друг на друга (рис. 2, а, б), противоречащее линейной гипотезе.}}}}}}}

Противоречия с линейной последовательностью экспрессии антигенов в ходе дифференцировки могут быть суммированы следующим образом. Во-первых, 20 % клеток CD34^{+/CD38⁻ могут экспрессировать антигены линейно-дифференцированных клеток использованного коктейля. Во-вторых, в пуповинной крови более половины клеток с фенотипом CD34^{+/CD38⁻ экспрессирует миелоидный антиген CD117. В-третьих, количество клеток с фенотипами CD133^{+/CD38⁻ и CDCP1^{+/CD38⁻ меньше ожидаемого: 70 % клеток CD34-/CD133⁺, считающихся ранними предшественниками, экспрессируют CD38. Исходя из предположения о более раннем появлении в гемопоэзе CD133 и CDCP1, чем CD34, ожидаемое количество клеток CD38-/CD133⁺ и CD38-/CDCP1⁺ должно быть не меньше, чем CD34-/CD133⁺ и CD34-/CDCP1⁺, а больше, чем клеток с CD34^{+/CD38⁻, что противоречит недавно полученным данным (Koutna et al., 2011). В-четвертых, определяются клетки с «противоречивыми» фенотипами: CD34-/CD38^{+/CD133⁺ и CD34-/CD38^{+/CDCP1⁺. В-пятых, количество клеток с фенотипами CDCP1^{+/CD117⁺ и CD133^{+/CD117⁺ слишком велико, если предполагать, что эти маркеры начинают экспрессироваться раньше CD34.}}}}}}}}}

Данные факты указывают на то, что линейная схема экспрессии по крайней мере для CD38 и CD117 не выполняется.

Противоречия можно снять следующими предположениями: клетки CD34^{+/CD38⁻ могут приобретать экспрессию линейных антигенов до повышения уровня экспрессии CD38, а экспрессия CD117 может включаться на клетках с фенотипом CD34⁻. Это не свидетельствует о необратимой миелоидной дифференцировке. Дальнейшее исследование клеток с фенотипами CD117^{+/CD133⁺/CD34⁻ и CD117^{+/CDCP1^{+/CD34⁻ представляет значительный интерес.}}}}

Наши данные подтверждают предположение о стохастическом (Blackett, Gordon, 1999) или реверсивном (Tajima et al., 2001; Colvin et al., 2004) характере экспрессии антигенов CD38 и CD117 на СКК самых верхних уровней. Кроме линейной и реверсивной гипотез существуют еще 2 модели, описывающие фенотип СКК. Модель клonalного разнообразия (Sieburg et al., 2006; Wilson et al., 2008) постулирует существование нескольких пуллов (клонов) гемопоэтических клеток, каждый из которых способен дифференцироваться во все типы клеток, но в текущих условиях дает клетки преимущественно лимфоидной или миелоидной линий. «Эволюционирующая» теория развития СКК (Donnelly, Krause, 2001) предполагает наличие нескольких фенотипически различных пуллов стволовых клеток, способных к самоподдержанию и плюрипотентной дифференцировке. Переход от одного фенотипа к другому может быть обратимым.

С другой стороны, высокие уровни корреляции экспрессии CD34, CD133, CDCP1 и CD117 позволяют предположить существование общих факторов регуляции экспрессии данных антигенов.

Список литературы

- Воробьев А. И., Бриллиант М. Д., Андреева Н. Е., Абрамов М. Г., Барказан З. С., Бронштейн М. И., Виноградова Ю. Е., Воробьев И. А., Городецкий В. М., Грибова И. А. 1985. Руководство по гематологии. В 2 т. М.: Медицина. 447 и 367 с.
- Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. 2001. Иммунология. М.: Мир. 592 с.
- Чертков И. Л., Дризе Н. И., Воробьев А. И. 2006. Схема кроветворения. Тер. архив. 78 (7) : 5—12.
- Bellantuono I. 2004. Haemopoietic stem cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 : 607—620.
- Benedetti F. 1996. CD34⁺ cells: biological aspects. Tumori. 82 (Suppl. 2) : S3—S13.
- Bhatia M., Bonnet D., Murdoch B., Gan O. I., Dick J. E. 1998. A newly discovered class of human haemopoietic cells with SCID-repopulating activity. Nat. Med. 4 : 1038—1045.
- Blackett N., Gordon M. 1999. «Stochastic»—40 years of use and abuse. Blood. 93 : 3148—3149.
- Bonnet D. 2002. Haematopoietic stem cells. J. Pathol. 197 : 430—440.
- Brandt J. E., Srour E. F., van Besien K., Hoffman R. 1990. Characterization of human hematopoietic stem cells. Prog. Clin. Biol. Res. 352 : 29—36.
- Bühring H. J., Kučí S., Conze T., Rathke G., Bartolović K., Grünebach F., Scherl-Mostageier M., Brümmendorf T. H., Schweifer N., Lammers R. 2004. CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. Stem Cells. 22 : 334—343.
- Bühring H. J., Seiffert M., Bock T.A., Scheding S., Thiel A., Scheffold A., Kanz L., Brugger W. 1999. Expression of novel surface antigens on early hematopoietic cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 872 : 25—38; discussion 38—39.
- Colvin G. A., Lambert J. F., Moore B. E., Carlson J. E., Donor M. S., Abedi M., Cerny J., Quesenberry P. J. 2004. Intrinsic hematopoietic stem cell/progenitor plasticity: inversions. J. Cell. Physiol. 199 : 20—31.
- D'Arena G., Musto P., Cascavilla N., Di Giorgio G., Zendoli F., Carotenuto M. 1996. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. Haematologica. 81: 404—409.
- De Bruyn C., Delforge A., Bron D., Bernier M., Massy M., Ley P., de Hemptinne D., Stryckmans P. 1995. Comparison of the coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR antigens on CD34⁺ purified cells from human cord blood and bone marrow. Stem Cells. 13 : 281—288.

- De Bruyn C., Delforge A., Lagneaux L., Bron D.* 2000. Characterization of CD34⁺ subsets derived from bone marrow, umbilical cord blood and mobilized peripheral blood after stem cell factor and interleukin 3 stimulation. *Bone Marrow Transplantation*. 25 : 377—383.
- De Wynter E. A., Buck D., Hart C., Heywood R., Coutinho L. H., Clayton A., Rafferty J. A., Burt D., Guenechea G., Bueren J. A., Gagen D., Fairbairn L. J., Lord B. I., Testa N. G.* 1998. CD34⁺AC133⁺ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells*. 16 : 387—396.
- Donnelly D. S., Krause D. S.* 2001. Hematopoietic stem cells can be CD34⁺ or CD34⁻. *Leuk. Lymphoma*. 40 : 221—234.
- Dykstra B., Kent D., Bowie M., McCaffrey L., Hamilton M., Lyons K., Lee S. J., Brinkman R., Eaves C.* 2007. Long term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo*. *Cell Stem Cell*. 1 : 218—229.
- Escribano L., Ocqueteau M., Almeida J., Orfao A., San Miguel J. F.* 1998. Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk. Lymphoma*. 30 : 459—466.
- Forraz N., Pettengell R., McGuckin C. P.* 2004. Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for *ex vivo* expansion and enriched for LTC-IC. *Stem Cells*. 22 : 100—108.
- Gadd S. J., Ashman L. K.* 1985. A murine monoclonal antibody specific for a cell-surface antigen expressed by a subgroup of human myeloid leukaemias. *Leuk. Res.* 9 : 1329—1336.
- Gallacher L., Murdoch B., Wu D. M., Karanu F. N., Keeney M., Bhatia M.* 2000. Isolation and characterization of human CD34⁺LIN⁻ and CD34⁺LIN⁻ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 95 : 2813—2820.
- Giebel B., Punzel M.* 2008. Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biol. Chem.* 389 : 813—824.
- Gothot A., Pyatt R., McMahon J., Rice S., Srour E. F.* 1997. Functional heterogeneity of human CD34⁽⁺⁾ cells isolated in subcompartments of the G₀/G₁ phase of the cell cycle. *Blood*. 90 : 4384—4393.
- Haeryfar S. M., Hoskin D. W.* 2004. Thy-1: more than a mouse Pan-T cell marker. *J. Immunol.* 173 : 3581—3588.
- Kawashima I., Zanjani E., Almada-Porado G., Flake A., Zeng H., Ogawa M.* 1996. CD34⁺ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood*. 87 : 4136—4142.
- Kondo M., Wagers A. J., Manz M. G., Prohaska S. S., Scheerer D. C., Beilhack G. F., Shizuru J. A., Weissman I. L.* 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Ann. Rev. Immunol.* 21 : 759—806.
- Koutna I., Peterkova M., Simara P., Stejskal S., Tesarova L., Kozubek M.* 2011. Proliferation and differentiation potential of CD133⁺ and CD34⁺ populations from the bone marrow and mobilized peripheral blood. *Ann. Hematol.* 90 : 127—137.
- Kurtzberg J., Laughlin M., Graham M. L., Smith C., Olson J. F., Halperin E. C., Ciocci G., Carrier C., Stevens C. E., Rubinstein P.* 1996. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N. Engl. J. Med.* 335 : 157—166.
- McGuckin C. P., Pearce D., Forraz N., Tooze J. A., Watt S. M., Pettengell R.* 2003. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *Eur. J. Haematol.* 71 : 341—350.
- Nimgaonkar M. T., Roscoe R. A., Persichetti J., Rybka W. B., Winkelstein A., Ball E. D.* 1995. A unique population of CD34⁺ cells in cord blood. *Stem Cells*. 13 : 158—166.
- Notta F., Doulatov S., Laurenti E., Poepll A., Jurisica I., Dick J. E.* 2011. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333 : 218—221.
- Perey L., Peters R., Pampallona S., Schneider P., Gross N., Leyvraz S.* 1998. Extensive phenotypic analysis of CD34 subsets in successive collections of mobilized peripheral blood progenitor. *Br. J. Haematol.* 103 : 618—629.
- Rutella S., Bonanno G., Marone M., de Ritis D., Mariotti A., Voso M. T., Scambia G., Mancuso S., Leone G., Pierelli L.* 2003. Identification of a novel subpopulation of human cord blood CD34⁺CD133⁺CD7⁺CD45⁺ lineage-cells capable of lymphoid/NK cell differentiation after *in vitro* exposure to IL-15. *J. Immunol.* 171 : 2977—2988.
- Sakabe H., Ohmizono Y., Tanimukai S., Kimura T., Mori K. J., Abe T., Sonoda Y.* 1997. Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived CD34⁺ cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38 and c-kit antigens. *Stem Cells*. 15 : 73—81.
- Sieburg H. B., Cho R. H., Dykstra B., Uchida N., Eaves C. J., Muller-Sieburg C. E.* 2006. The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood*. 107 : 2311—2316.
- Sperling C., Schwartz S., Büchner T., Thiel E., Ludwig W. D.* 1997. Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias. *Haematologica*. 82 : 617—621.
- Tajima F., Deguchi T., Laver J. H., Zeng H., Ogawa M.* 2001. Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 97 : 2618—2624.
- Timeus F., Crescenzi N., Basso G., Ramenghi U., Saracco P., Gabutti V.* 1998. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34⁺ cells. *Stem Cells*. 16 : 120—126.
- Wang T. Y., Chang S. J., Chang M. D., Wang H. W.* 2009. Unique biological properties and application potentials of cd34⁺ cd38⁻ stem cells from various sources. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 48 : 356—369.
- Wilson A., Laurenti E., Oser G., van der Wath R. C., Blanco-Bose W., Jaworski M., Offner S., Dunant C. F., Eshkind L., Bockamp E., Lió P., Macdonald H. R., Trumpp A.* 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 135 : 1118—1129.
- Yin A. H., Miraglia S., Zanjani E. D., Almada-Porada G., Ogawa M., Leary A. G., Olweus J., Kearney J., Buck D. W.* 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 90 : 5002—5012.
- Zanjani E. D., Almada-Porada G., Livingston A. G., Flake A. W., Ogawa M.* 1998. Human bone marrow CD34⁺ cells engraft *in vivo* and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp. Hematol.* 26 : 353—360.

Поступила 2 IV 2012

EXPRESSION OF EARLY HEMATOPOIETIC MARKERS IN CORD BLOOD
AND MOBILIZED BLOOD*A. V. Panteleev,¹ I. A. Vorobjev^{1–3}*¹ National center for hematology, Moscow,² A. N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology of M. V. Lomonosov State Universityand ³ Biological Faculty of M. V. Lomonosov Moscow State University;

e-mail: panteleev@yandex.ru

G-CSF mobilized peripheral blood and cord blood are major sources of hematopoietic progenitor cells. These cells are characterized by the expression of «early» antigens. We have evaluated the coexpression of hematopoietic cell markers CD34, CD133, CD90, CDCP1, CD117 and activation antigen CD38 using multicolor flow cytometry. We show that (1) cells being positive for every single antigen form a separate population. (2) Percentage of cells expressing each «early» antigen are twice more in the cord blood than in the mobilized blood. The content of cells with complex progenitor phenotype (CD34+/CD38-/CD117-, CD133+/CD34+/CD38-, CDCP1+/CD34+/CD38- etc.) is equal in mobilized and cord blood. (3) There are strong positive correlations between the expression of CD34, CD133, CD117 and CDCP1 in both groups. Positive correlation exists for CD90 with CD34, CD133, CDCP1 and CD117 only in cord blood and is not significant in mobilized blood. The analyses of early antigens coexpression with activation marker CD38 revealed that hypothesis on sequential activation and loss of expression of the aforementioned antigens is not confirmed. We assume that there is global regulation of the expression of CD34, CD133, CDCP1 and CD117. Yet expression of CD38 could be reversibly abolished during maturation of the hemopoietic cells and CD117 could be expressed not only on myeloid cells.

Key words: flow cytometry, hematopoietic stem cell, CD34, CD133, CD117, CDCP1, cord blood, G-CSF mobilized peripheral blood.