

DOI: 10.18523/2617-4529.2026.9.70-79

УДК 576.535+612.119+57.086.83

Сорочинська Х. І.<sup>1,2</sup>, Ватліцов Д. В.<sup>2,3</sup>, Довгопола Н. С.<sup>2</sup>,  
Ткаченко А. В.<sup>2</sup>, Білько Н. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Національний університет «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

<sup>2</sup> ТОВ «Центр ембріональних тканин “ЕмСелл”», Київ, Україна

<sup>3</sup> Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, Київ, Україна

## МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ РІЗНИХ ТЕРМІНІВ ГЕСТАЦІЇ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Визначення характеристик біооб'єктів для безпечної та ефективною клітинної терапії залишається критично важливим через обмеженість офіційних критеріїв оцінювання якості клітинних препаратів. Гемопоетичні стовбурові клітини ефективно лікують численні патології, а пошук і детальна характеристика альтернативних джерел цих клітин є надзвичайно актуальними для сучасної медицини.

Метою дослідження було встановити закономірності морфофункціональних характеристик гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) та клітин-попередників на ранніх етапах ембріогенезу фетальної печінки в умовах *in vitro*, зокрема щодо їхньої проліферації, диференціювання та колонієутворюючої здатності. У 5–11-тижневих зразках фетальної печінки визначено ключові закономірності розвитку гемопоетичних клітин-попередників: стовбурові та прогеніторні клітини зберігають стабільний колонієутворюючий потенціал, водночас абсолютний вміст колонієутворюючих одиниць (КУО) зростає у 18 разів, а інтегральний показник здатності до колонієутворення та проліферації зростає на ~54 % із гестаційним віком. Виявлено онтогенетичний зсув колонієутворення: домінування еритроїдних колоній на 5-му тижні ( $48,0 \pm 15,5$  проти  $4,8 \pm 3,1$ ) із подальшим підвищенням кількості мієлоїдних колоній на 11-му тижні ( $7,6 \pm 5,9$ ), що відображає фізіологічні процеси гемопоетичного дозрівання *in vivo*. Імунофенотиповий аналіз демонструє помірне зниження частоти  $CD34^+/CD45^-$  клітин-попередників при 24-кратному зростанні абсолютної кількості та стабільній частоті  $CD34^+/CD133^+$  клітин, що відображає гестаційно зумовлене дозрівання субпопуляцій зі збереженням ядра примітивного пулу стовбурових клітин. Отримані дані свідчать, що фетальна печінка є якісним джерелом ГСК та клітин-попередників. Високий проліферативний потенціал та здатність до самооновлення фетальних гемопоетичних клітин-попередників, підтверджені оцінюванням їхньої функціональної активності, розширюють перспективи для ефективного клінічного застосування в регенеративній медицині.

**Ключові слова:** гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК), гемопоетичні клітини-попередники, колонієутворююча одиниця (КУО), фетальна печінка, ембріогенез, колонієутворююча активність, проточна цитометрія, культура *in vitro*.

### Вступ

Фетальний гемопоез у печінці є ключовим етапом розвитку кровотворної системи, під час якого ГСК і клітини-попередники активно

проліферують, диференціюються та формують основу для функціонування зрілої гемопоетичної системи. Печінка ембріона стає головним органом кровотворення на ранніх етапах

розвитку і виконує роль тимчасової, але високо-ефективної ніші для експансії стовбурових клітин. У період приблизно з 5-го по 11-й тиждень гестації вона трансформується з первинного місця колонізації примітивних клітин у структурований гемопоетичний орган, здатний підтримувати мультилінійне диференціювання та інтенсивну проліферацію, самооновлення ГСК у комітовані клітини крові [1-3]. У цей час формуються складні взаємодії між гемопоетичними клітинами та мікрооточенням печінки, яке містить гепатоцити, ендотеліальні клітини та мезенхімальні стромальні елементи, що створюють оптимальні умови, зокрема, внаслідок формування спеціалізованих гемопоетичних ніш із чіткою просторово-часовою організацією для розвитку ГСК та клітин-попередників [4,8].

Формування фетального гемопоезу відбувається за чітко координованою просторово-часовою програмою. Перші справжні ГСК виникають у регіоні аорто-гонадо-мезонефросу, звідки вони мігрують до печінки приблизно на 5-му тижні гестації [5,6]. Після колонізації печінка стає основним органом гемопоезу, де відбувається експоненційне зростання кількості ГСК та формування різноманітних популяцій попередників. Ці клітини здатні до еритроїдного, мієлоїдного та лімфоїдного диференціювання, що забезпечує швидке формування системи крові ембріона [3,7]. До того ж мікрооточення фетальної печінки не лише підтримує проліферацію, але й регулює баланс між самооновленням та диференціюванням клітин [4].

Попри значний прогрес у розумінні розвитку гемопоезу, механізми, що визначають співвідношення різних субпопуляцій ГСК і клітин-попередників та їхні функціональні властивості, залишаються недостатньо дослідженими. Зі збільшенням терміну гестації клітинність фетальної печінки зростає експоненційно, однак взаємозв'язок між кількісними змінами клітин та їхніми функціональними характеристиками, а саме проліферативною здатністю, клоногенним потенціалом і схильністю до лінійного диференціювання, досі вивчено неповністю [9,10]. Деякі дослідження свідчать, що протягом ранніх етапів розвитку відбувається поступовий перехід від домінування примітивного еритропоезу до більш складної системи мультилінійного кровотворення, що відображає загальну програму дозрівання гемопоетичної системи [11].

Фетальні ГСК та клітини-попередники мають низку унікальних біологічних властивостей, які відрізняють їх від ГСК постнатального періоду. Зокрема, вони мають підвищену проліферативну

активність, більшу здатність до самооновлення та високу експресію генів, пов'язаних із репарацією ДНК, антиоксидантним захистом та клітинним метаболізмом [6,12]. Ці особливості забезпечують швидке розширення популяції клітин крові, необхідне для інтенсивного росту ембріона. Крім того, фетальні ГСК та клітини-попередники демонструють вищу метаболічну активність, включно з посиленою мітохондріальною функцією та більшою ефективністю клітинного циклу, що сприяє їхній високій регенеративній здатності [1]. У міру розвитку (збільшення тижнів гестації) та поступового перенесення основного осередку гемопоезу до кісткового мозку ці властивості змінюються, що супроводжується зниженням проліферативної активності та більшою спеціалізацією клітин [4].

Важливим аспектом дослідження гемопоетичних клітин є оцінювання їхнього колонієутворюючого потенціалу та здатності до формування колоній. Саме тест на колонієутворюючу здатність *in vitro* вважають «золотим стандартом» для функціонального оцінювання кровотворних клітин-попередників та широко застосовують для аналізу їхнього диференціального потенціалу [7]. Ці методи дають змогу визначити співвідношення різних типів колоній, зокрема еритроїдних, гранулоцитарно-макрофагальних та мультипотентних попередників, що відображає функціональну структуру гемопоетичної системи на певному етапі розвитку.

Сучасні дослідження активно поєднують функціональні тести з імунофенотипуванням клітин за допомогою багатопараметричної проточної цитометрії. Маркери CD34, CD45 та CD133 широко використовують для ідентифікації різних стадій розвитку гемопоетичних клітин від примітивних стовбурових до більш диференційованих попередників [10,13]. Комбінований аналіз цих маркерів дає змогу більш точно визначати субпопуляції ГСК і клітин-попередників, їхній ступінь зрілості та потенціал до самооновлення. Крім того, оцінювання функціонального стану клітин, включно з показниками метаболічної активності, мембранної цілісності та рівнем спонтанної активації, може слугувати важливим індикатором життєздатності клітин і прогнозувати їхню терапевтичну ефективність [14].

З огляду на перспективи використання фетальних гемопоетичних клітин у регенеративній медицині та клітинній терапії, зростає інтерес до дослідження їхніх морфофункціональних характеристик на ранніх етапах розвитку. Фетальні ГСК і клітини-попередники розглядають як перспективне джерело клітин для трансплантації, внутрішньоутробної терапії генетичних

захворювань та створення клітинних препаратів нового покоління [3,5]. Завдяки високій проліферативній здатності і потенціалу до мультилінійної реконституції ці клітини є особливо привабливими для клінічного застосування.

**Метою** дослідження було з'ясування кореляційних зв'язків між терміном гестації та морфологічно-функціональним станом гемопоетичних клітин-попередників фетальної печінки. Визначення параметрів їхньої життєдіяльності в умовах *in vitro* (проліферація, колонієутворення, лінійне диференціювання) є критично важливим для розуміння онтогенезу гемопоєзу та розроблення новітніх біотехнологічних підходів у регенеративній медицині.

### Матеріали та методи дослідження

Для дослідження використовували суспензії клітин фетальної печінки, виділених з ембріонів людини на 5–11 тижнях гестації, отриманих після планового переривання вагітності з соціальних причин за наявності інформованої згоди в акредитованих закладах охорони здоров'я. Роботу з фетальними тканинами проведено відповідно до етичних принципів, затверджених Комітетом з питань етики при Кабінеті Міністрів України, методичних рекомендацій «Етичні питання та норми при роботі з ембріональними тканинами людини» (Міністерство охорони здоров'я України, 20.09.2004), національних етичних та правових стандартів, а також положень Гельсінської декларації [15].

Для кожного гестаційного тижня клітинні суспензії відбирали випадковим чином із криобанку, де вони зберігалися в рідкому азоті за температури  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Для кожного терміну гестації відбирали по 20 зразків об'ємом 1 мл із концентрацією  $(8,5 \pm 3,5) \times 10^6$  клітин/мл та життєздатністю клітин  $>90\%$ . Зразки були протестовані та підтверджені як вільні від бактеріальних, грибкових і вірусних патогенів, включно з HIV-1, HIV-2, HPV, HBV, HCV, EBV, CMV, HHV-6, HSV-1/2, *Treponema pallidum*, вірусом краснухи, *Parvovirus B19*, *Mycoplasma genitalium*, *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma parvum* та *Ureaplasma urealyticum*.

Оцінювання колонієутворюючої здатності та проліферативного потенціалу клітин фетальної печінки проводили відповідно до інструкції виробника набору *Human Methylcellulose Complete Media Kit* (R&D Systems, Catalog # HSC003). Після розморожування зразків кількість життєздатних клітин визначали методом проточної цитометрії. 8000 життєздатних клітин, ресуспендованих у *Cell Resuspension Solution* (R&D

Systems, Catalog # HSC003), вносили в 1 мл *Human Methylcellulose Complete Media* та висівали у 24-лункові планшети. Культивування проводили в  $\text{CO}_2$ -інкубаторі за температури  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в атмосфері  $5\%$   $\text{CO}_2$  та за відносної вологості  $95\%$  протягом 14 діб. Диференційований підрахунок колоній здійснювали на 11–14-ту добу культивування.

Аналіз імунофенотипу гемопоетичних клітин у суспензії фетальної печінки проводили методом проточної цитометрії на цитометрі CyFlow Space (Sysmex, Німеччина) із використанням лазерів із довжинами хвиль 488 нм та 635 нм. Клітинні суспензії забарвлювали моноклональними антитілами, міченими FITC/PE до CD45/CD34 (BD Biosciences, США), а також антитілами, міченими APC до CD133 (BD Biosciences, США). Для оцінювання життєздатності клітин використовували пропідій йодид, тіазоловий оранжевий та тетраметилродамін етиловий ефір. Збір та обробку даних здійснювали з використанням програмного забезпечення FlowMax 2.9 (Quantum Analysis GmbH, Німеччина).

Статистичний аналіз було виконано мовою програмування Python із використанням бібліотек *scipy*, *statsmodels* та *scikit-learn* відповідно до загальноприйнятих стандартів обробки біологічних масивів даних. Для вибору між параметричними та непараметричними методами здійснювали ретельну перевірку розподілу на нормальність за допомогою тестів Шапіро – Вілка та Колмогорова – Смирнова.

Міжгрупові порівняння проводили з використанням дисперсійного аналізу (ANOVA) для нормально розподілених даних або непараметричного критерію Краскела – Волліса в інших випадках. Для контролю помилки множинних порівнянь застосовували *post hoc* тести Даннетта або Манна – Уїтні з корекцією частоти хибних виявлень (FDR). Кореляційний аналіз парних зв'язків між предикторами та показниками КУО проводили за методом Пірсона, а для розподілів, що відрізнялися від нормального, додатково розраховували коефіцієнти рангової кореляції Спірмена. Статистично значущими вважали результати за  $p < 0,05$ ; значення  $p < 0,10$  розглядали як тенденцію, що потребує подальшого вивчення.

Було побудовано моделі багатофакторної регресії методом найменших квадратів. Якість моделей оцінювали за скоригованим коефіцієнтом детермінації ( $R^2$ ), загальним рівнем значущості ( $p$ ), стандартною помилкою апроксимації та діагностикою залишків.

### Результати

У цьому дослідженні проаналізовано 140 суспензій фетальної печінки з 5-го по 11-й тиждень гестації по 20 суспензій клітин на кожний досліджуваний термін гестації, що дало змогу оцінити морфофункціональні характеристики ГСК та клітин-попередників на ранніх етапах ембріогенезу завдяки підрахунку колоній з ідентифікацією їхніх типів та оцінюванням імунофенотипу.

Абсолютні показники КУО продемонстрували чітку залежність від гестаційного віку, збільшуючись від  $0,125 \pm 0,066 \times 10^6$  КУО (див. таблицю) на суспензію на 5-му тижні до  $2,292 \pm 0,788 \times 10^6$  КУО та на 11-му тижні (рангова кореляція Спірмена  $\rho = 0,743$ ,  $p = 2,06 \times 10^{-88}$ ). Це 18-кратне збільшення виходу КУО, зумовлене розширенням гемопоетичної ніші, відповідало росту маси тканини фетальної печінки та кількості життєздатних клітин.

На відміну від загального виходу КУО, внутрішня колонієутворююча ефективність не залежала від гестаційного віку. Проліферативний потенціал не демонстрував статистично значущої кореляції з тижнем гестації, що свідчить про стабільну проліферативну та колонієутворюючу здатність гемопоетичних клітин-попередників упродовж 5–11 тижнів ембріонального розвитку.

Динаміка колонієутворення ГСК і клітин-попередників із фетальної печінки в умовах культивування *in vitro* (рис. 1) свідчить про те, що, хоча загальна кількість гемопоетичних клітин-попередників суттєво зростає зі збільшенням гестаційного віку, їхні внутрішні функціональні характеристики залишаються стабільними [4].

У разі культивування *in vitro* гемопоетичні клітини-попередники фетальної печінки формують усі типи колоній (рис. 2) та демонструють високу колонієутворюючу здатність на всіх термінах гестації, що підтверджує перспективність фетальної печінки як джерела ГСК.

Таблиця

Кількісна характеристика гемопоетичних клітин-попередників на різних термінах гестації

Тиждень гестації	Загальна кількість КУО ( $\times 10^6$ )	Проліферативний потенціал
5-й	$0,125 \pm 0,066$	$0,660 \pm 0,205$
6-й	$0,238 \pm 0,121$	$0,751 \pm 0,351$
7-й	$0,392 \pm 0,203$	$0,694 \pm 0,327$
8-й	$0,559 \pm 0,204$	$0,608 \pm 0,232$
9-й	$0,927 \pm 0,326$	$0,630 \pm 0,277$
10-й	$1,729 \pm 0,752$	$0,739 \pm 0,264$
11-й	$2,292 \pm 0,788$	$0,680 \pm 0,237$

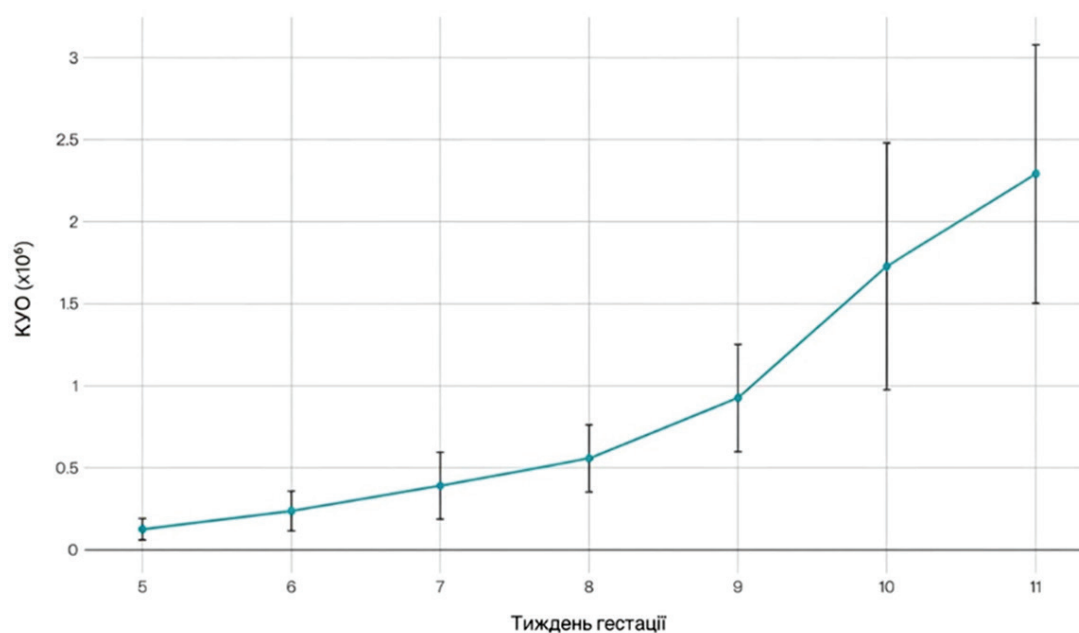
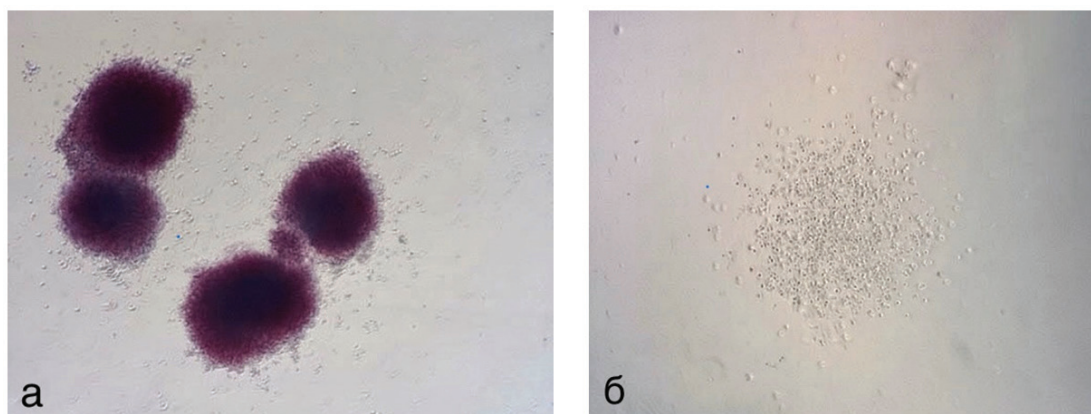
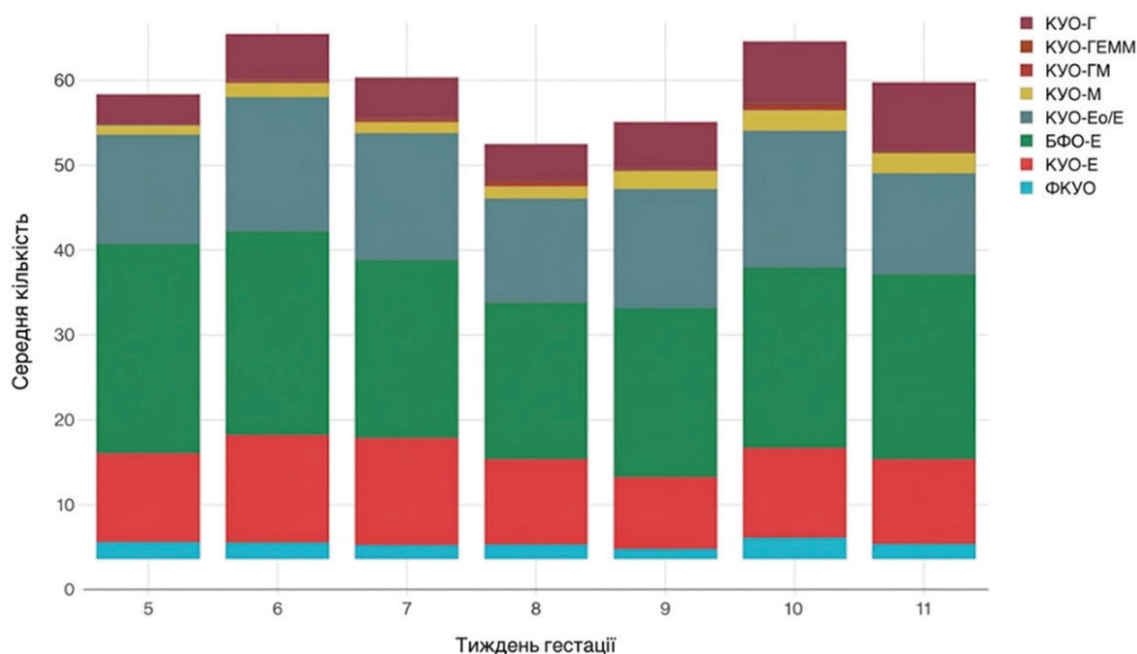


Рис. 1. Динаміка колонієутворення ГСК і клітин-попередників із фетальної печінки в умовах культивування *in vitro* на етапах раннього ембріогенезу з 5-го по 11-й тиждень гестації



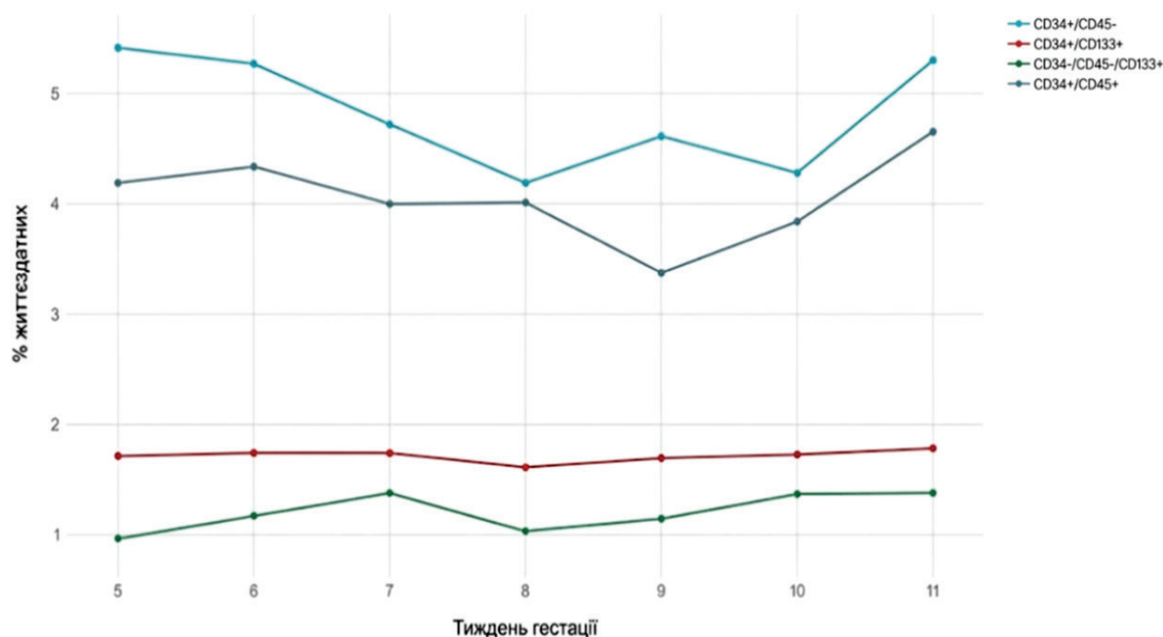
**Рис. 2.** Колонії гемопоетичних клітин-попередників у культурі *in vitro* фетальної печінки: *a* – еритроїдна колонієутворююча одиниця (КYO-Е), *б* – гранулоцитарно-макрофагальна колонієутворююча одиниця (КYO-ГМ), зб.  $\times 50$ . Інвертований мікроскоп



**Рис. 3.** Розподіл типів колонієутворюючих одиниць (КYO) з 5-го по 11-й гестаційний тиждень

Колонії КYO-Е домінували на всіх гестаційних стадіях, хоча їхня частка поступово зменшувалася – приблизно з 44 % на 5-му тижні до 36 % на 11-му тижні (рис. 3). Паралельно колонії КYO-Г демонстрували найбільш виражене зростання з 6,3 % до 15,4 %, що свідчить про поступове зміщення гемопоезу в бік гранулопоезу в міру дозрівання фетальної гемопоетичної системи [16]. Колонії КYO-М показали більш помірне збільшення з 2 % до 4 %. Така динаміка свідчить про поступову лінійну комітованість клітин у фетальній печінці, що оптимізує гемопоетичний вихід відповідно до зростаючих фізіологічних потреб організму, що розвивається [4].

За допомогою проточної цитометрії вдалось продемонструвати чіткі імунофенотипові профілі, що змінювалися залежно від гестаційного віку. У дослідженні виділено чотири популяції за імунофенотипом, а саме: примітивні ГСК –  $CD34^+/CD45^-$ ; ГСК і клітини-попередники –  $CD34^+/CD133^+$ ; ранні клітини-попередники –  $CD34^+/CD45^+/CD133^+$ ; комітовані гемопоетичні клітини-попередники –  $CD34^+/CD45^+$ . Відсотковий вміст поверхневих маркерів ГСК і клітин-попередників відносно загальної кількості життєздатних клітин на різних термінах гестації показує чіткі закономірності (рис. 4).



**Рис. 4.** Відсотковий вміст поверхневих маркерів ГСК і клітин-попередників (відносно загальної кількості життєздатних клітин) на різних термінах гестації

Частка примітивної субпопуляції клітин-попередників CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> показала помірне, але статистично значуще зниження з 5,29 ± 2,26 % на 5-му тижні до 4,09 ± 1,53 % на 10-му тижні, після чого спостерігалось повторне зростання до 5,09 ± 1,27 % на 11-му тижні.

Частка примітивних гемопоетичних клітин-попередників CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> демонструвала статистично значуще зниження зі збільшенням гестаційного віку. Така закономірність узгоджується з даними літератури, які свідчать про пікові значення CD34<sup>+</sup> клітин у період 8–10 тижнів гестації з подальшим їх зменшенням [16]. Хоча абсолютна кількість клітин CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> зростала, їхня відносна частка зменшувалася внаслідок зростаючих популяцій дозріваючих гемопоетичних клітин.

Популяція CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> не демонструвала статистично значущих змін залежно від гестаційного віку. Така пропорційна стабільність узгоджується зі спостереженнями, що частота CD133<sup>+</sup> ГСК/мультипотентних попередників у фетальній печінці істотно не відрізняється від джерел постнатального періоду, що свідчить про відносно постійний розмір справжнього стовбурово-клітинного компартменту [4]. Стабільність цієї популяції вказує на її критичну та тривалу роль у підтриманні гемопоезу протягом фетального розвитку.

Фракція плюрипотентних ГСК CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> залишалася надзвичайно стабільною протягом усіх тижнів гестації (середній діапазон

1,56–1,71 %,  $p = 0,595$ ). Аналогічно популяція комітованих клітин-попередників CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> не показала значущого зв'язку з віком гестації ( $p = -0,069$ ,  $p = 0,125$ ), зберігаючи стабільну частку 3,27–4,45 % у період 5–11 тижнів гестації.

Сукупно ці результати свідчать про траєкторію диференціювання, за якої примітивна популяція CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>, незважаючи на зростання її абсолютної кількості, пропорційно робить менший внесок у загальний клітинний пул у міру диференціювання та дозрівання комітованих клітин-попередників [4,16].

Усі чотири популяції демонструють приріст з віком гестації: абсолютна кількість примітивних гемопоетичних стовбурових клітин (рис. 5) CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> зростає від  $0,84 \times 10^6$  на 5-му тижні до  $19,9 \times 10^6$  на 11-му тижні (24-кратне збільшення), кількість клітин популяції CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> – від  $0,28 \times 10^6$  до  $7,7 \times 10^6$ , ранніх клітин-попередників CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> – від  $0,15 \times 10^6$  до  $5,4 \times 10^6$ , а комітованих клітин-попередників CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> – від  $0,82 \times 10^6$  до  $22,1 \times 10^6$ .

Абсолютне зростання найбільше в популяції CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> та CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, що відображає інтенсивний розвиток як примітивних, так і комітованих гемопоетичних популяцій під час онтогенезу фетальної печінки. Високий рівень експресії CD34<sup>+</sup> клітин у мононуклеарних клітинах фетальної печінки, особливо в період 8–11-го тижнів гестації, свідчить про значний гемопоетичний потенціал цієї тканини [16].

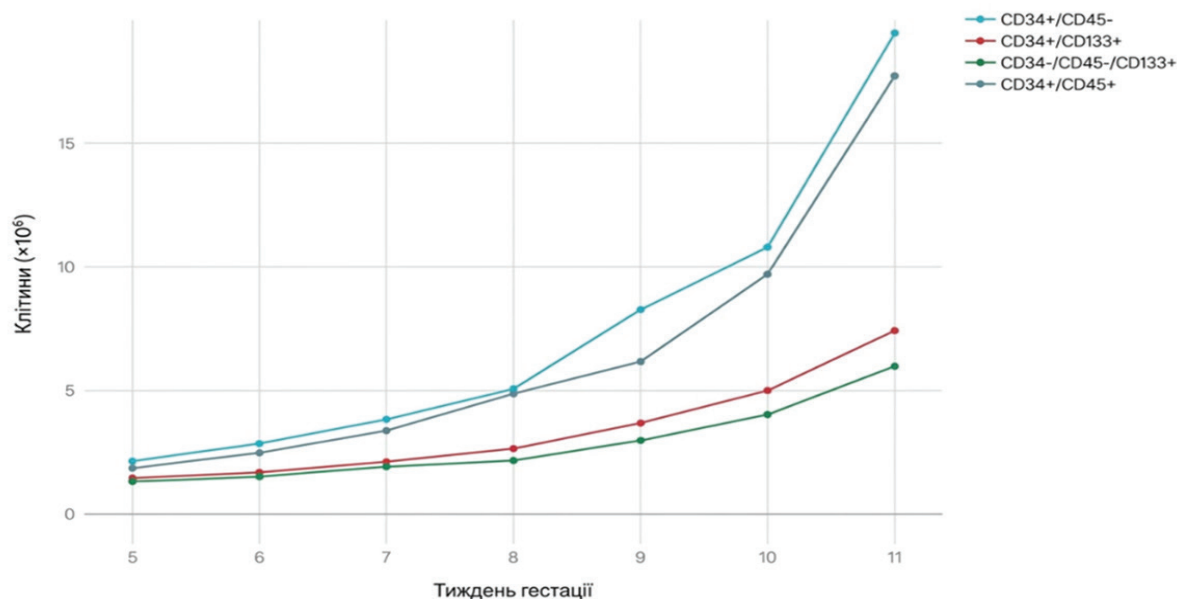


Рис. 5. Абсолютна кількість ГСК і клітин-попередників на різних термінах гестації

### Обговорення

Отримані результати свідчать, що вік гестації є ключовим детермінантом збільшення загальної кількості гемопоетичних клітин-попередників завдяки одночасному розширенню маси тканини фетальної печінки та її клітинності, що зумовлює ~18-кратне зростання загального вмісту КУО з 5-го до 11-го тижня гестації. Така динаміка узгоджується з класичними уявленнями про гемопоез у фетальній печінці, який досягає піка між 12-м та 24-м тижнями, з подальшою міграцією до кісткового мозку [2,5]. Виявлений сильний прямий кореляційний зв'язок між терміном гестації та загальною кількістю колонієутворюючих одиниць (коефіцієнт рангової кореляції Спірмена  $\rho = 0,743$ ,  $p = 2,06 \times 10^{-88}$ ) свідчить про те, що вік гестації є визначальним чинником у формуванні пулу гемопоетичних клітин. Отримані дані узгоджуються з сучасними уявленнями про експансію гемопоетичної ніші фетальної печінки, яка забезпечує інтенсивне збільшення пулу гемопоетичних клітин завдяки взаємодії з мікрооточенням та просторово-часовій організації ніші [8].

Водночас стабільність проліферативного потенціалу та ефективності колонієутворення вказує на те, що розширення відбувається переважно завдяки збільшенню кількості клітин, а не зміні їхніх функціональних властивостей. Подібний феномен описано для фетальних ГСК, які мають високу проліферативну активність, але відносно стабільні функціональні параметри на ранніх стадіях розвитку [7,17]. Це узгоджується з концепцією «масштабування через експансію пулу»,

що дає змогу уникнути передчасного виснаження стовбурових клітин.

Зменшення частки  $CD34^+/CD45^-$  клітин у динаміці гестації відображає поступове дозрівання гемопоетичного компартменту та зсув у бік більш диференційованих популяцій. Це відповідає відомим моделям розвитку, згідно з якими ранні ГСК, що походять з аорто-гонадо-мезонефросу, колонізують фетальну печінку, де активно проліферують і диференціюються в лінійно-комітовані клітини, після чого мігрують до кісткового мозку [3,10]. Отже, зміни фенотипу можуть відображати як локальне диференціювання, так і міграційні процеси між гемопоетичними нішами.

Стабільна частка  $CD34^+/CD133^+$  клітин упродовж усіх досліджуваних гестаційних термінів (1,56–1,71 %;  $p = 0,595$ ) свідчить про існування механізмів, що підтримують пул найбільш примітивних ГСК на відносно сталому рівні. Водночас варто зазначити, що  $CD133$  розглядають як маркер субпопуляції примітивних ГСК із високим потенціалом самооновлення [13]. Відсутність залежності цього показника від гестаційного віку вказує на те, що найпримітивніший резерв стовбурових клітин зберігає відносно стабільну чисельність попри загальне збільшення органа, що, ймовірно, відображає жорстке регулювання з боку мікрооточення фетальної печінки. Відомо, що клітинні компоненти ніші, зокрема ендотеліальні та стромальні клітини, продукують ключові регуляторні фактори (SCF та CXCL12), які забезпечують баланс між самооновленням і диференціюванням ГСК [3,18]. Крім того, сигнальні шляхи Notch і Wnt відіграють

критичну роль у підтриманні примітивного стану ГСК, тоді як їх дисрегуляція пов'язана з передчасним диференціюванням та виснаженням стовбурового пулу [18].

Виявлена позитивна кореляція між експресією CD133 та колонієутворюючою здатністю узгоджується з даними про функціональну значущість цього маркера. CD133<sup>+</sup> клітини демонструють підвищений проліферативний і репопуляційний потенціал як у фетальних, так і в постнатальних джерелах гемопоєзу [13], що підтверджує його придатність як критерію відбору клітин із високою функціональною активністю.

Аналіз розподілу колонієутворюючих одиниць показує збереження рівня еритроїдних колоній ( $48,0 \pm 15,5$  на 5-му тижні та  $43,7 \pm 18,9$  на 11-му тижні) за одночасного зростання мієлоїдних колоній (з  $4,8 \pm 3,1$  до  $7,6 \pm 5,9$ ). Це відображає фізіологічний перехід від домінування еритропоєзу до формування мультилінійного гемопоєзу [2,3]. На ранніх етапах розвитку (5–8 тижнів) фетальна печінка виконує переважно еритропоєтичну функцію, забезпечуючи кисневі потреби ембріона [2,5], тоді як на пізніших етапах розвитку (9–11 тижнів) активується грануло- та моноцитопоєз, що пов'язано з дозріванням імунної системи та набуттям мультилінійної компетентності [3].

Отже, результати демонструють, що для раннього фетального гемопоєзу характерне збалансоване поєднання інтенсивної експансії клітинного пулу, поступового фенотипового дозрівання та стабільного підтримання примітивної фракції ГСК, що забезпечує ефективне формування гемопоєтичної системи.

З практичного погляду, отримані результати мають значення для вибору оптимального джерела фетальних гемопоєтичних клітин. Для ранніх

гестаційних термінів характерна вища проліферативна активність клітин, тоді як пізніші забезпечують більший абсолютний вихід клітин зі збереженням їхніх функціональних характеристик. Це відкриває можливості для диференційованого підходу до використання клітин залежно від клінічних потреб.

### Висновки

У цьому дослідженні фетальної печінки 5–11 тижнів гестації визначено основні закономірності раннього розвитку гемопоєтичних клітин-попередників: ГСК і клітини-попередники зберігають стабільну колонієутворюючу активність, водночас абсолютний вміст КУО зростає у 18 разів, а інтегральний показник здатності до колонієутворення та проліферації зростає на 54 % із терміном гестації.

Виявлено онтогенетичний зсув колонієутворення: спостерігається домінування еритроїдних колоній на 5-му тижні ( $48,0 \pm 15,5$  проти  $4,8 \pm 3,1$ ) з подальшим підвищенням кількості мієлоїдних колоній на 11-му тижні ( $7,6 \pm 5,9$ ), що відображає фізіологічні процеси гемопоєтичного дозрівання *in vivo*. Імунофенотипування показало помірне зниження CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>прогеніторних клітин водночас із 24-кратним збільшенням абсолютної кількості, тоді як CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> клітини залишаються стабільними, що відображає гестаційно зумовлене дозрівання субпопуляцій зі збереженням ядра примітивного пулу стовбурових клітин.

Ці дані підкреслюють терапевтичний потенціал фетальних гемопоєтичних клітин для регенеративних протоколів, забезпечуючи стандартизовану основу для оцінювання їхньої функціональної придатності.

### References

- Azzoni E, Fantin A. Fetal liver hematopoiesis revisited: a precast hierarchy. *Nat Cardiovasc Res.* 2022;1(10):872. doi: 10.1038/s44161-022-00142-5
- Ivanovs A, Rybtsov S, Ng ES, Stanley EG, Elefany AG, Medvinsky A. Human haematopoietic stem cell development. *Development.* 2017;144(13):2323-37. doi: 10.1242/dev.134866
- Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature.* 2018;553:418-26. doi: 10.1038/nature25022
- Popescu DM, Botting RA, Stephenson E, Green K, Webb S, Jardine L, et al. Decoding human fetal liver haematopoiesis. *Nature.* 2019;574(7778):365-71. doi: 10.1038/s41586-019-1652-y
- Ivanovs A, Rybtsov S, Welch L, Anderson RA, Turner ML, Medvinsky A. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic AGM region. *J Exp Med.* 2011;208(12):2417-31. doi: 10.1084/jem.20111688
- Lewis K, Yoshimoto M, Takebe T. Fetal liver hematopoiesis: from development to delivery. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):139. doi: 10.1186/s13287-021-02189-w
- Benz C, Copley MR, Kent DG, Wöhler S, Cortés A, Aghaepour N, et al. Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development. *Cell Stem Cell.* 2012;10(3):273-83. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.007
- Mesquita Peixoto M, Soares-da-Silva F, Bonnet V, Zhou Y, Ronteix G, Santos RF, Mailhe MP, Nogueira G, Feng X, Pereira JP, Azzoni E, Anselmi G, de Bruijn MFTR, Perkins A, Baroud CN, Pinto-do-Ó P, Cumano A. Spatiotemporal dynamics of fetal liver hematopoietic niches. *J Exp Med.* 2025;222(2):e20240592. doi: 10.1084/jem.20240592. Epub 2025 Jan 7. PMID: 39775824; PMID: PMC11706214.
- Lotto J, Stephan TL, Hoodless PA. Fetal liver development and implications for liver disease pathogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2023;20(9):561-77. doi: 10.1038/s41575-023-00775-2
- Calvanese V, Capellera-Garcia S, Ma F, Fares I, Liebscher S, Ng ES, et al. Mapping human haematopoietic stem cells from haemogenic endothelium to birth. *Nature.* 2022;604(7906):534-40. doi: 10.1038/s41586-022-04571-x
- Yokomizo T, Ideue T, Morino-Koga S, Tham CY, Sato T, Takeda N, et al. Independent origins of fetal liver haematopoietic stem and progenitor cells. *Nature.* 2022;609(7928):779-84. doi: 10.1038/s41586-022-05203-0

12. Guo X, Chu L, Ke F, Mu L, Li Z, Cai JJ, et al. Recipient bone marrow assimilates the myeloid/lymphoid reconstitution of distinct fetal hematopoietic stem cells. *Oncotarget*. 2017;8(65):108981-995. doi: 10.18632/oncotarget.22479
13. Vanuytsel K, Villacorta-Martin C, Lindstrom-Vautrin J, et al. Multi-modal profiling of human fetal liver hematopoietic stem cells reveals the molecular signature of engraftment. *Nat Commun*. 2022;13:1103. doi: 10.1038/s41467-022-28616-x
14. Furer N, Rappoport N, Milman O, Lifshitz A, Bercovich A, Ben-Kiki O, et al. Natural and age-related variation in circulating human hematopoietic stem cells. 2023. doi: 10.1101/2023.11.30.569167
15. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Participants. *JAMA*. 2025;333(1):71-4. doi: 10.1001/jama.2024.21972
16. Bhardwaj R, Kumar L, Chhabra D, Mehra N, Sharma A, Mohanty S, et al. *In vitro* expansion of fetal liver hematopoietic stem cells. *Sci Rep*. 2021;11(1):11234. doi: 10.1038/s41598-021-91272-6
17. Kasbekar M, Mitchell CA, Proven MA, Passegué E. Hematopoietic stem cells through the ages: A lifetime of adaptation to organismal demands. *Cell Stem Cell*. 2023;30(11):1403-20. doi: 10.1016/j.stem.2023.09.013. Epub 2023 Oct 20. PMID: 37865087; PMCID: PMC10842631.
18. Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system. *Development*. 2011;138(6):1017-31. doi: 10.1242/dev.040998

**K. Sorochnytska<sup>1,2</sup>, D. Vatlitsov<sup>2,3</sup>, N. Dovhopola<sup>2</sup>, A. Tkachenko<sup>2</sup>, N. Bilko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup> LLC “Embryonic Tissue Center ‘EmCell’”, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup> Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

## MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS FROM DIFFERENT GESTATIONAL STAGES IN *IN VITRO* CULTURE

### Abstract

The characterization of biological materials for safe and effective cell therapy remains critically important due to the limited official criteria for assessing the quality of cellular products. Hematopoietic stem cells effectively treat numerous pathologies, and the search for, as well as the detailed characterization of, alternative sources of these cells is highly relevant for modern medicine.

The aim of this study was to establish the patterns of morphofunctional characteristics of hematopoietic stem cells and their progenitors at early stages of fetal liver embryogenesis *in vitro*, specifically regarding their proliferation, differentiation, and colony-forming capacity. In 5–11-week fetal liver samples, key developmental patterns of hematopoietic progenitor cells were identified: stem and progenitor cells maintain a stable clonogenic potential, while the absolute content of colony forming units increases 18-fold, and the integrated potency index rises by ~54% with gestational age. An ontogenetic shift in colony formation was observed, with erythroid colonies predominating at week 5 ( $48.0 \pm 15.5$  vs  $4.8 \pm 3.1$ ) followed by an increase in myeloid colonies at week 11 ( $7.6 \pm 5.9$ ), reflecting physiological hematopoietic maturation *in vivo*. Immunophenotypic analysis demonstrates a moderate decrease in the frequency of CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> progenitors alongside a 24-fold increase in their absolute number and a stable frequency of CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> cells, reflecting gestationally driven maturation of subpopulations while maintaining the core of the primitive stem cell pool. The data obtained indicates that the fetal liver is a high-quality source of hematopoietic stem cells and their progenitors. The high proliferative potential and self-renewal capacity of fetal hematopoietic progenitor cells, confirmed by the assessment of their functional competence, open broad prospects for effective clinical application in regenerative medicine.

**Keywords:** hematopoietic stem cells, hematopoietic progenitor cells, colony-forming unit, fetal liver, embryogenesis, colony-forming activity, flow cytometry, *in vitro* culture.

*Submitted 17.03.2026*

*Accepted 07.04.2026*

*Published 28.05.2026*

## Відомості про авторів

### Authors Information

**Сорочинська Христина Ігорівна** – аспірантка ОНП «Лабораторна діагностика біологічних систем» Національного університету «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА); керівниця лабораторного департаменту ТОВ «Центр ембріональних тканин “ЕмСелл”», Київ, Україна

**Khrystyna Sorochynska** – Graduate Student of the “Laboratory Diagnostics of Biological Systems” program, National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA); Head of the Laboratory Department at LLC “Embryonic Tissue Center ‘EmCell’”, Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0009-0002-7241-1071>

kh.sorochynska@emcell.com

**Ватліцов Денис Володимирович** – кандидат біологічних наук, доцент кафедри природничих наук, інформаційних технологій та філософії Національного університету охорони здоров’я України імені П. Л. Шупика; старший науковий співробітник науково-дослідної лабораторії ТОВ «Центр ембріональних тканин “ЕмСелл”», Київ, Україна

**Denys Vatlitsov** – PhD, Associate Professor at the Department of Natural Sciences, Information Technologies and Philosophy, Shupyk National Healthcare University of Ukraine; Senior Researcher at the Research and Development Laboratory of LLC “Embryonic Tissue Center ‘EmCell’”, Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0001-8771-6623>

denys.vatlitsov@gmail.com

**Довгопола Надія Станіславівна** – старший науковий співробітник науково-дослідної лабораторії ТОВ «Центр ембріональних тканин “ЕмСелл”», Київ, Україна

**Nadiia Dovhopola** – Senior Researcher at the Research and Development Laboratory of LLC “Embryonic Tissue Center ‘EmCell’”, Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0002-0614-9979>

dovna@outlook.com

**Ткаченко Алла Володимирівна** – провідний біотехнолог та керівниця біотехнологічної лабораторії ТОВ «Центр ембріональних тканин “ЕмСелл”», Київ, Україна

**Alla Tkachenko** – Lead Biotechnologist and Head of the Biotechnology Laboratory at LLC “Embryonic Tissue Center ‘EmCell’”, Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0009-0008-7708-7411>

tkachenkoalla08@gmail.com

**Білько Надія Михайлівна** – доктор медичних наук, професор, професор кафедри лабораторної діагностики біологічних систем, керівниця Центру молекулярних і клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), гарант ОНП «Лабораторна діагностика біологічних систем» НаУКМА, Київ, Україна

**Nadiia Bilko** – M.D., Professor, Professor of the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems, Head of Center of Molecular and Cell Research of National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), guarantor of the “Laboratory Diagnostics of Biological Systems” program NaUKMA, Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0002-3213-0032>

nbilko@ukma.edu.ua

