

## ФЕНОТИП І МІГРАЦІЙНИЙ ПОТЕНЦІАЛ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН З НАТИВНОЇ ТА КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ

В. А. Шаблій<sup>1,2</sup>

М. Д. Кучма<sup>1,2</sup>

В. М. Кирик<sup>3</sup>

Г. М. Онищенко<sup>2</sup>

О. М. Цупіков<sup>3</sup>

П. П. Клименко<sup>3</sup>

П. О. Арешков<sup>1</sup>

О. В. Кучук<sup>3</sup>

Л. Л. Лукаш<sup>1</sup>

Г. С. Лобинцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

<sup>2</sup>Інститут клітинної терапії, Київ

<sup>3</sup>ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини  
НАМН України», Київ

E-mail: v\_shabliy@ukr.net

Отримано 11.09.2012

Мультипотентні мезенхімні стромальні клітини плацентарного походження використовують для лікування критичної ішемії нижніх кінцівок, дилатаційної кардіоміопатії та відновлення кровотворення після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин. З огляду на це актуальними завданнями є розроблення методів кріоконсервування тканини плаценти, виділення з неї мультипотентних мезенхімних стромальних клітин, вивчення їхніх молекулярно-біологічних властивостей, здатності до мультилінійного диференціювання та регенеративного потенціалу. В роботі показано, що такі клітини, отримані з нативної та кріоконсервованої тканини плаценти людини, мають схожі морфологію, імунофенотип та здатність до мультилінійного диференціювання. Уперше встановлено, що плацентарні мультипотентні мезенхімні стромальні клітини мають ознаки мезенхімних та епітеліальних клітин, містять популяції цитокератин 7-позитивних клітин, які експресують віментин та CD90. Нами було виділено клітини, що мігрують з тканини плаценти під час культивування в присутності сироватки людини, схожі за імунофенотипом до мультипотентних мезенхімних стромальних клітин. Ці мультипотентні мезенхімні стромальні клітини здатні до заселення ушкодженої серцевої тканини *in vivo*.

**Ключові слова:** плацента, мультипотентні мезенхімні стромальні клітини, кріоконсервування, кардіоміопатія, міокард.

Дослідження останніх років показали, що плацента людини виконує кровотворну функцію, є нішею гемопоетичних стовбурових клітин і може бути потенційним джерелом мультипотентних мезенхімних стромальних клітин (ММСК) для регенеративної медицини [1]. Лікування критичної ішемії кінцівок за допомогою трансплантації ММСК плаценти людини проходить другу стадію клінічних випробувань [2]. Наразі розроблено й упроваджено в клінічну практику технологію виділення, культивування та кріоконсервування ММСК плаценти людини [3]. Також у роботі Серікова та ін. описано метод кріоконсервування плаценти людини, в якому розчин кріопротекторів (15% -й пропіленгліколь, 14% -й ДМСО, 14% -й формаїд) вводять в плаценту через пуповинну вену і про-

водять заморожування в холодильній камері при  $-80^{\circ}\text{C}$  [4]. Цей метод було розроблено авторами для виділення гемопоетичних прогеніторних клітин шляхом перфузії судин плаценти розчином з антагоністом стромального фактора (SDF-1) AMD3100. Слід зазначити, що такий підхід потребує використання високих концентрацій кріопротекторів, не дає змоги контролювати процеси кристалотворення, обмежує повторне використання плаценти для отримання стовбурових клітин. Також було розроблено велику кількість методів кріоконсервування фрагментів тканини плаценти людини [5], однак не описано придатність їх для виділення та культивування ММСК з кріоконсервованої тканини. Нами було розроблено технологію виділення ММСК з кріоконсервованої плаценти людини [6].

Таким чином, на цей час залишаються недостатньо опрацьованими методи збереження тканини плаценти, виділення та культивування ММСК. Не вивчено властивості ММСК, отриманих з нативної і кріоконсервованої тканини плаценти.

Також було висунуто припущення, що клітини плаценти здатні проникати в материнську кров у результаті спрямованої міграції на компоненти плазми крові, мігрувати в тканини материнського організму, особливо за їх ушкодження чи запалення, та диференціюватись у тканинно-специфічні спеціалізовані клітини під впливом мікросередовища [7]. Однак залишається багато невивчених питань стосовно властивостей цих клітин, їх походження і регенераторного потенціалу.

### Матеріали і методи

#### *Кріоконсервування тканини плаценти*

Плаценту отримували в умовах пологового залу/операційної після фізіологічних пологів або операції кесаревого розтину на терміні вагітності 39–41 тиждень у пацієнток віком 23–36 років на підставі попередньої інформованої згоди.

Із плаценти виділяли фрагмент тканини клиноподібної форми, що відходить від пуповини, розмірами 10×10×5 см та масою близько 70 г. Тканину плаценти промивали розчином Хенкса з додаванням 50 од/мл амфотерицину, 100 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептомицину, після чого тканину перенесли в ємність з розчином Хенкса та подрібнювали на фрагменти не більше 3 мм.

Для кріоконсервування фрагментовану тканину перенесли в кріоампули і додавали розчин 20% -го диметилсульфоксиду (ДМСО, Sigma) до кінцевої концентрації 1,4 М.

Кріоконсервування здійснювали за допомогою програмного заморозувача ЗП-6.00.00.00 (Спеціальне конструкторсько-технологічне бюро з дослідним виробництвом Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України) відповідно до раніше описаної технології [6]. Процес охолодження розпочинали з 20 °С зі швидкістю 1 °С/хв до температури –6 °С, проводили ініціацію кристалоутворення. За цієї температури зразки витримували впродовж 10 хв. Після завершення кристалізації кріоконтейнери охолоджували зі швидкістю 0,3 °С/ хв до –35 °С, потім –5 °С/хв до –50 °С та –10 °С/ хв до –140 °С. За температури –140 °С процес охолодження в заморозувачі зупиняли й перенесли матеріал у рідкий азот (–196 °С) на довгострокове зберігання.

Зразки тканини відбирали для проведення аналізу на відсутність HCV, HBV, CMV, HSV 1/2, EBV, Treponema pallidum, Toxoplasma gondii, HIV-1, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum і parvum, бактеріальної та грибової флори.

Кріоконсервовану тканину розморозували на водяній бані за температури 38–40 °С до появи рідкої фази з подальшим відтаюванням при кімнатній температурі. Видалення кріозахисного розчину, що містить ДМСО, проводили шляхом повільного додавання розчину Хенкса до препарату кріоконсервованих фрагментів плаценти до концентрації ДМСО 0,5% та подальшим фільтруванням фрагментів плаценти з перенесенням їх у розчин Хенкса.

#### *Отримання ММСК з нативної та кріоконсервованої тканини плаценти*

Тканину нативної плаценти промивали розчином Хенкса і подрібнювали. Клітини з нативної та кріоконсервованої тканини плаценти виділяли методом ферментації в розчині 0,1% -ї колагенази I (Serva, Німеччина) і 0,6 од/мл диспази (Gibco, Німеччина) упродовж 10–30 хв за температури 37 °С. Для зниження активності ензимів додавали фетальну бичачу сироватку (ФБС, Sigma, США) до кінцевої концентрації 10%. Отриману суспензію пропускали через фільтр з діаметром пор 70 мкм (Becton Dickinson, США) і відмивали центрифугуванням упродовж 10 хв при 300 g. Осад клітин ресуспендували в розчині Хенкса та висівали в ростове середовище ДМЕМ (Sigma, США) зі вмістом 15% ФБС (Gibco, Німеччина), 2 мМ глютаміну, 5 мМ HEPES (Biomedicals), 100 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептомицину. Культивування проводили в культуральних флаконах для адгезивних клітин з розрахунку 300–400 тис. клітин на 1 см<sup>2</sup> за 37 °С в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> зі зміною середовища 2 рази на тиждень. Пересів здійснювали після досягнення культурою 80–90% конфлюентності моношару в співвідношенні 1:3. Для пересіву культуру обробляли впродовж 3–5 хв 0,05% -м розчином трипсину–ЕДТА (Biochrom, Німеччина) до повного відкріплення.

Довготривале культивування адгезивних клітин нативної та кріоконсервованої плаценти проводили за умов відсутності інфекційних агентів, бактеріальної та грибової флори.

Фрагменти тканини плаценти також культивували в середовищі ДМЕМ з 20% -м вмістом сироватки людини впродовж 14 діб.

Вміст флаконів пропускали послідовно через фільтри з діаметром пор 70 та 40 мкм. Суспензію клітин центрифугували впродовж 10 хв при 300 g, осад клітин ресуспендували в розчині Хенкса і вводили мишам у хвостову вену. З метою подальшого культивування осад клітин ресуспендували в середовищі ДМЕМ, що містить 15% ФБС (Gibco, Німеччина), 2 мМ глютаміну, 5мМ НЕРЕС (Biomedicals), 100 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину.

#### **Кріоконсервування ММСК плаценти**

ММСК із нативної плаценти знімали з пластику за допомогою 0,05% -го розчину трипсину-ЕДТА (Biochrom, Німеччина). Для інгібування трипсину до суспензії клітин вносили ФБС (Gibco, Німеччина) до кінцевої концентрації 15%. Клітини відмивали від трипсину шляхом центрифугування 5 хв при 300 g, осад клітин ресуспендували в розчині Хенкса. До клітин повільно додавали розчин Хенкса з 10% ДМСО до кінцевої концентрації 5% та кріоконсервували за програмою, що описана в роботі [8]. Заморожування проводили в програмному заморозувачі ЗП-6.00.00.00. За температури  $-140^{\circ}\text{C}$  процес охолодження в заморозувачі зупиняли й переносили матеріал у рідкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) на довгострокове зберігання. Життєздатність клітин після розморожування, визначена шляхом фарбування 0,05% трипановим синім, складала  $80 \pm 3,67\%$  ( $n = 5$ ).

#### **Проточна цитофлуориметрія культури клітин плаценти**

Імунофенотипування суспензії клітин проводили методом проточної цитометрії з використанням мишачих моноклональних антитіл anti-CD90 FITC (Becton Dickinson, США) у робочій концентрації 0,5 мкг на  $10^6$  клітин; первинного кролячого поліклонального антитіла anti-cytokeratin 7 (Novus Biological, США) у розведенні 1:20 та вторинного антитіла вівці проти кролячих імуноглобулінів, кон'югованого з флуорохромом Cy3 (Novus Biological, США) у розведенні 1:200.

Вимірювання виконували на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програмного забезпечення BD FACS Diva 6.1, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 6 параметрів флуоресценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів під

час багатопараметричного аналізу використовували контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним з антитіл окремо (single stained control) та зразки зі вторинним антитілом.

#### **Спрямоване диференціювання ММСК *in vitro***

Для визначення здатності клітин диференціюватися в остеогенному напрямку культуру клітин упродовж 3 пасажів культивували в середовищі ДМЕМ (Sigma, США) з  $10^{-7}$  М дексаметазону, 10 мМ  $\beta$ -гліцерофосфату і 0,1 мМ аскорбат-2-фосфату протягом 21 доби. Мінералізований матрикс виявляли фарбуванням 1% -м розчином алізаринового червоного (Sigma, США).

Для адипогенного диференціювання клітини культивували в ДМЕМ із додаванням 10% ФБС, 1 мкМ дексаметазону, 0,5 мМ ізобутил-метилксантину (Sigma, США), 0,1 мМ індометацину (Sigma, США) і 10 нг/мл інсуліну впродовж 21 доби. Жирові включення виявляли фарбуванням масляним червоним (Sigma, США).

Хондрогенне диференціювання проводили в середовищі ДМЕМ з 6,25 мкг/мл інсулін-трансферин-селеніту, 0,1 мкМ дексаметазону, 0,1 мМ аскорбат-2-фосфату і 10 нг/мл TGF- $\beta$ 3 протягом 21 доби. Диференціювання здійснювали з досягненням конфлюентності моношару клітин 80% та формуванням клітинами локального скупчення в краплі живильного середовища об'ємом 5 мкм за щільності посіву  $1,6 \cdot 10^7$  кл/мл. Для підтвердження хондрогенного диференціювання проводили кількісне оцінювання експресії мРНК колагену 2-го типу шляхом ПЛР в реальному часі.

Контролем слугували клітини, які культивували впродовж тих самих термінів у живильному середовищі без факторів диференціювання.

#### **Виділення РНК і проведення ПЛР**

РНК виділяли, використовуючи триреагент (Sigma, США). Отриману тотальну РНК обробляли ДНК-азою і застосовували для поставлення синтезу кДНК за методикою виробника (Fermentas, Німеччина). Для визначення експресії генів застосовували праймери (таблиця).

Специфічність праймерів і розміри амплікона оцінювали за допомогою програм Primer-3, послуговуючись базою даних NCBI.

## Праймери, використovanі для визначення експресії генів

№ п/п	Назва гена	Послідовність праймера	
		Прямий (Forward)	Зворотний (Reverse)
1	PPAR- $\gamma$ 2	5'TGTCAGTACTGTTCGGTTTC3'	5'AATGGTGATTTGTCTGTTG3'
2	SPP1	5'CTAGGCATCACCTGTGCCATACC3'	5'CAGTGACCAGTTCATCAGATTCATC3'
3	COL2A1	5'AGTGGAGACTACTGGATTGA3'	5'AGTGTACGTGAACCTGCTAT3'
4	OCT-4	5'AAGCGATCAAGCAGCGACTAT3'	5'GGAAAGGGACCGAGGAGTACA3'
5	NKX2-5	5'CAAGGACCCTAGAGCCGAAAAG3'	5'CCTGCGTGGACGTGAGTTTC3'
6	ACTB	5'GGACTTCGAGCAAGAGATGG3'	5'AGCACTGTGTTGGCGTACAG3'

Розмір амплікона для гена *PPAR- $\gamma$  2* — 257 н, *SPP1* — 331 н, *COL2A1* — 441 н, *OCT-4* — 163 н, *NKX2-5* — 236 н, *ACTB* — 234 н.

**FISH-аналіз**

Для проведення FISH-аналізу використовували криоконсервовані ММСК 3-го пасажу в кількості 200 тис. клітин, що їх було отримано з плаценти новонароджених чоловічої статі. Приготування препаратів для гібридизації виконували за стандартною методикою. Для гібридизації застосовували зонди CEPX SpectrumGreen probe і CEPY SpectrumOrange probe (Abbot Molecular, USA). Ядра фарбували з використанням DAPI (Abbot Molecular, USA). Мікροхимеризм материнських клітин визначали як відсоток ядер із сигналами двох X-хромосом, для аналізу підраховували 500 ядер. Візуалізацію проводили на флуоресцентному інвертованому мікроскопі Olympus IX71.

**Імуноцитохімічне дослідження**

Для здійснення імуноцитохімічного аналізу клітини висівали в 4-лункові планшети з площею лунки 1,9 см<sup>2</sup> (Nunclon™ $\Delta$  Surface), фіксували та перембілізували розчином ацетон/метанол у співвідношенні 1:1. Ендогенну пероксидазну активність інгібували 0,3% -м розчином H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> впродовж 5 хв. Неспецифічне зв'язування антитіл блокували, інкубуючи цитопрепарати за кімнатної температури в розчині 0,1 М фосфатного буфера, що містив 0,5% сироваткового альбуміну бика. Для детекції цитокератину 7 та лужної фосфатази використовували мишачі моноклональні антитіла (Dako, Данія) та поліклональні кролячі антитіла (Abscam, USA) відповідно. Візуалізацію імунних комплексів проводили із застосуванням Mouse/Rabbit PolyVue HRP/DAB Detection System (DBS, США).

Для подвійного фарбування на цитокератин 7 та віментин використовували первинні поліклональні кролячі антитіла проти цито-

кератину 7 (Novus Biological, США) і моноклональні мишачі антитіла проти віментину (Dako, Данія). Для візуалізації зв'язування первинних антитіл застосовували вторинні антитіла вівці проти кролячих (Novus Biological, США) та мишачих імуноглобулінів (Invitrogen, Німеччина), кон'югованих із флюорохромами Cy3 та Alexa 488 відповідно.

Одночасне виявлення цитокератину 7 та CD90 проводили з використанням первинних поліклональних кролячих антитіл проти цитокератину 7 (Novus Biological, США), вторинних овечих, кон'югованих з флюорохромом Cy3, та мишачих моноклональних проти CD90, кон'югованих з флюорохромом FITC (Becton Dickinson, США).

**Дослідження міграційного потенціалу клітин in vivo**

Експерименти з трансплантації ММСК плаценти тваринам було проведено на моделі кардіоміопатії у самок мишей лінії FVB віком 6 міс із масою тіла 25–30 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Усі роботи з експериментальними тваринами виконували з дотриманням вітчизняного та міжнародного законодавства щодо принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

Для моделювання кардіоміопатії нешемічного генезу у 19 тварин застосовували підшкірне (п/ш) введення ізопротеренолу (Sigma, США) у дозі 100 мг/кг в 0,1 мл 0,9% -го розчину NaCl 5 днів поспіль. Як контрольну групу використовували тварин, яким вводили 0,1 мл 0,9% -го розчину NaCl п/ш за аналогічною схемою.

ММСК із криоконсервованої тканини знімали з культурального пластику за допомогою 0,05% -го розчину трипсину-ЕДТА (Biocrom, Німеччина). Для інгібування трипсину до суспензії клітин вносили ФБС (Gibco, Німеччина) до кінцевої концентрації 15%. Клітини відмивали від трипсину шляхом центрифугування 5 хв при 300 г, осад

клітин ресуспендували в розчині Хенкса. На 21-шу добу після моделювання кардіоміопатії тваринам вводили нативні ММСК з кріоконсервованої тканини (група 1,  $n = 6$ ) та кріоконсервовані ММСК (група 2,  $n = 6$ ), що отримані з нативної тканини, у хвостову вену тричі по  $3,3 \times 10^5$  клітин в об'ємі 100 мкл розчину Хенкса з проміжком часу 1 год.

Тваринам, які були контролем для групи 1 ( $n = 2$ ) вводили тричі по 100 мкл розчину Хенкса, для групи 2 ( $n = 2$ ) — розчин Хенкса з 5% DMSO за аналогічною схемою.

До групи 3 входили миші з кардіоміопатією ( $n = 3$ ), яким вводили суспензію клітин, що мігрували із фрагментів тканини плаценти під час культивування в присутності сироватки людини за вище описаною схемою. Тваринам, які були контролем для групи 3, вводили розчин Хенкса.

#### **Проточна цитофлуориметрія клітин серця**

Для виявлення клітин людини в серці мишей методом проточної цитометрії суспензію клітин отримували шляхом ензиматичного виділення. Тканину серця промивали в PBS і подрібнювали за допомогою ножиць. Клітини виділяли методом ферментації в розчині 0,2% -ї колагенази I (Serva, Німеччина) і 0,6 од/мл диспази (Gibco, Німеччина). Після ферментації тканини впродовж 15 хв при температурі 37 °С розчин ензимів з тканиною піпетували і продовжували інкубувати 40 хв. Для інактивації ензимів до клітин додавали ФБС до кінцевої концентрації 10%. Суспензію клітин фільтрували через клітинний фільтр з діаметром пор 70 мкм (Becton Dickinson, США), центрифугували впродовж 10 хв зі швидкістю 300 g. Супернатант відбирали й до осаду клітин додавали первинні mouse anti-human IgG<sub>2b</sub> HLAABC-антитіла (Millipore, США) в розведенні 1:50. Клітини інкубували протягом 20 хв при +4 °С, двічі відмивали в буфері CellWash і 20 хв — за температури 4 °С з 20 мкл вторинних rat anti-mouse IgG<sub>2a+b</sub> PerCP-антитіл (Becton Dickinson, США). Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програмного забезпечення BD FACS Diva 6.1. Як контроль використовували клітини, які інкубували зі вторинним антитілом.

#### **Імунофлуоресцентне дослідження міокарда методом імуногістохімії**

Парафінові зрізи, що були приготовлені за класичною методикою, депарафінували

двічі по 5 хв при 37 °С у хлороформі, регідратували 5 хв за кімнатної температури в 100%-му розчині етанолу, 3 хв — у 96%-му, 1 хв — у 70%-му, 1 хв — у 50%-му розчині етанолу та двічі по 5 хв в 0,1 М розчині фосфатно-сольового буфера (pH = 7,4).

Демаскування антигенів проводили в 0,01 М цитратному буфері (pH = 6) упродовж 10 хв.

Для пермеабілізації зразки обробляли 0,3%-м розчином Triton X-100 (Sigma, США) на 0,1 М фосфатному буфері за кімнатної температури протягом 10 хв. Неспецифічне зв'язування блокували впродовж 30 хв за кімнатної температури за допомогою 0,1 М фосфатного буфера, що містив 1% нормальної сироватки кіз (Sigma, США), 0,3% Triton X-100 та 0,5% сироваткового альбуміну бика (Sigma, США).

Первинні мишачі антитіла проти мітохондрій людини (Millipore, США) у розведенні 1:50 на 0,1 М фосфатному буфері, що містив 0,3% Triton X-100 та 0,5% сироваткового альбуміну бика, наносили на зрізи й інкубували при температурі +4 °С впродовж 18 год. Після інкубації препарати відмивали від первинних антитіл тричі по 10 хв в 0,1 М фосфатному буфері.

Зразки інкубували протягом 1,5 год за кімнатної температури зі вторинними антитілами, кон'югованими з флюорохромом Alexa 488 (Molecular Probes Inc., США), у розведенні 1:1 000 на 0,1 М фосфатному буфері. Після інкубації препарати відмивали від вторинних антитіл тричі по 10 хв в 0,1 М фосфатному буфері.

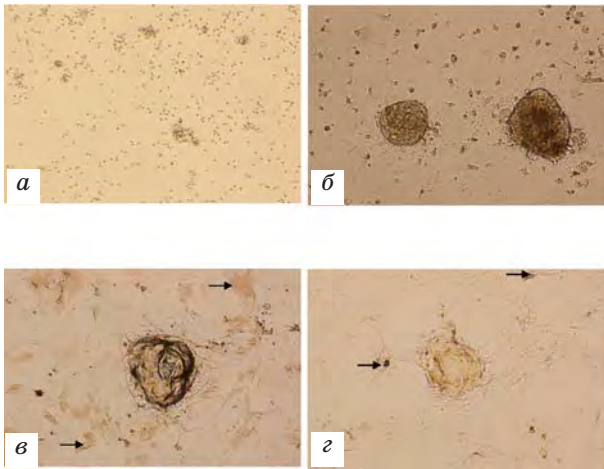
#### **Статистична обробка результатів**

Під час планування експериментів використовували схему рандомізованих блоків. Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики: розраховували значення середніх арифметичних величин ( $M$ ) і помилку середньої ( $m$ ). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерії Вілкоксона та Манна-Уїтні. Зміни показників вважали вірогідними при  $P < 0,05$ . Розрахунки проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Office Excel.

#### **Результати та обговорення**

Фрагменти тканини плаценти культивували в рідкому середовищі в присутності сироватки крові людини. Після 14 днів культивування в середовищі спостерігали появу великої кількості клітин з багатьма

відростками, тимчасом як у разі культивування з ФБС — поодинокі клітини (рис. 1). Зі зміною сироватки крові людини на ФБС на 14-ту добу клітини прикріплювалися до пластику і на 19-ту добу утворювали агрегати, навколо яких росли фібробластоподібні та епітеліальні клітини. Імуноцитохімічним аналізом встановлено, що деякі фібробластоподібні та епітеліальні клітини були позитивними на цитокератин 7, тоді як невеликі округлі клітини — на лужну фосфатазу. За подальшого культивування навколо агрегатів формувалися ділянки проліферації стромальних клітин, що морфологічно подібні до клонів плацентарних ММСК.



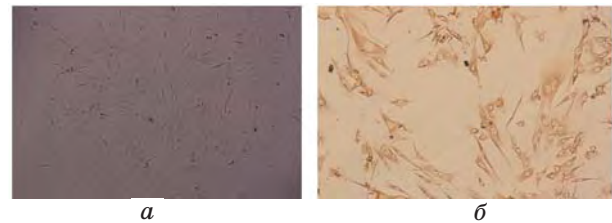
**Рис. 1. Клітини, що їх виділено з тканини плаценти в присутності сироватки людини:**  
 а — культура нативних клітин, 7-ма доба культивування із сироваткою людини; б — агрегати стромальних клітин плаценти, 16-та доба культивування в присутності ФБС; імуноцитохімічне виявлення цитокератину 7 (в) та лужної фосфатази (г); коричневий колір — позитивні клітини (позначені стрілками).  $\times 50$

Таким чином, із тканини плаценти людини в присутності сироватки людини в умовах *in vitro* можна виділити клітини, які експресують лужну фосфатазу, цитокератин 7 і мають проліферативну активність. Виходячи з того, що позаворсинчастий трофобласт (ПВТ) також експресує лужну фосфатазу та цитокератин 7 [9, 10], можна припустити, що отримана популяція клітин представлена ПВТ. Здатність ПВТ до міграції, хемотропізм до факторів сироватки крові [10,11] та високий потенціал до епітеліально-мезенхімальної трансформації (ЕМТ) [12, 13] були описані раніше. Також показано, що агрегати, які утворюються з клітин, виділених із тканини плаценти в присутності сироватки людини, морфологічно подібні до клонів мультипотентних клітин цитотрофобласта [9].

### Характеристика ММСК кріоконсервованої плаценти

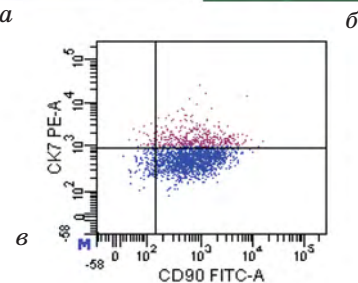
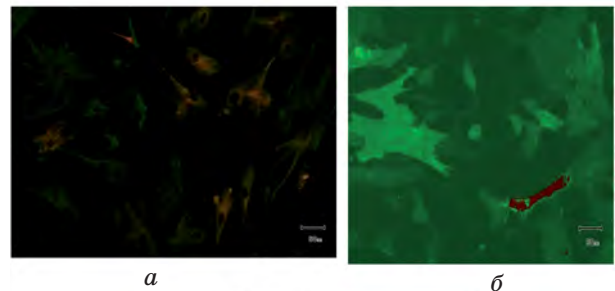
Клони фібробластоподібних клітин спостерігали на 8-му та 14-ту доби при культивуванні нативних [14] та кріоконсервованих фрагментів тканини плаценти. ММСК, що отримані з нативної [14] та кріоконсервованої тканини плаценти [15], мали схожий імунофенотип, на першому пасажі продукували лужну фосфатазу (рис. 2), упродовж трьох пасажів — віментин, були позитивними за CD105, CD73, CD90, HLA-ABC і негативними за поверхневими маркерами гемопоетичних клітин CD34, CD133, CD45, CD14.

Подібно до ММСК з нативної тканини, клітини, що їх отримано з кріоконсервованої плаценти, також містили мінорну популяцію клітин, позитивних на цитокератин 7 та віментин, цитокератин 7 і CD90 (рис. 3).



**Рис. 2. Культура клітин кріоконсервованої плаценти:**

а — нативна культура клітин.  $\times 50$ ;  
 б — імуноцитохімічне виявлення лужної фосфатази (коричневий колір).  $\times 100$



**Рис. 3. Подвійне фарбування культури ММСК плаценти:**

на цитокератин 7 та віментин (а), цитокератин 7 та CD90 (б). Двовимірний гистограма (в) популяції ММСК з фенотипом  $CK7^+CD90^+$ ; CK7 — цитокератин 7

Слід зазначити, що ММСК, виділені з амніотичної оболонки, також мають міноРНУ популяцію цитокератин 7- та віментин-позитивних клітин [16]. Присутність у плацентарних ММСК популяції клітин, що одночасно несуть маркери клітин трофобласта (цитокератин 7) та мезенхімних клітин (віментин, CD90), свідчить про можливе її виникнення внаслідок епітеліально-мезенхімальної трансформації клітин ПВТ. Було встановлено, що в ПВТ у разі мігрування в ендометрій матки спостерігається експресія цитокератину 7 та віментину [17, 18]. Також описано, що трансформація епітеліальних клітин під впливом конституційної експресії генів *Snail*, *Twist*, *TGF-β* призводить до набуття епітеліальними клітинами імунофенотипу ММСК, а саме експресії CD90, CD105, CD44, CD 73, CD10 та віментину. Епітеліальні клітини після індукції ЕМТ мали потенціал до диференціювання в адипогенному, хондрогенному й остеогенному напрямках [19].

За допомогою цитогенетичного аналізу встановлено, що ММСК, отримані з кріоконсервованої тканини, мали генотип новонародженого і містили 0,33% материнських клітин. ПЛР-аналіз ММСК з кріоконсервованої тканини показав експресію *OCT-4*, *SPP1*, *COL2A1*, *PPAR-γ2* та відсутність *NKX2-5* (рис. 4), чого не спостерігається в ММСК з нативної плаценти [14].



Рис. 4. Електрофореграма результатів ПЛР-аналізу кДНК ММСК кріоконсервованої плаценти на 3-му пасажі з праймерами: до *PPAR-γ2*, *SPP1*, *NKX2-5*, *COL2A1*, *OCT-4*, *АСТВ* ( $\beta$ -actin)

Експресія генів *SPP1* і *PPAR-γ2* також може свідчити про спорідненість ММСК плаценти з трофобластом [14]. У разі трансплантації ММСК плаценти *in utero* в плоди щурів порівняно високий вміст донорських клітин спостерігали в плаценті під шаром цитотрофобласта в зоні знаходження прогеніторних клітин трофобласта [20]. Зважаючи на хоумінг клітин до власної ніші, можна припустити, що плацентарні ММСК походять з клітин, які розміщені під шаром цитотрофобласта.

У культурі *in vitro* клітини диференціювалися в адипогенному, остеогенному та хондрогенному напрямках (рис. 5, 6).

За культивування цих клітин в остеогенному середовищі спостерігається зростання експресії *SPP1* майже вдвічі стосовно контролю, тимчасом як у разі культивування ММСК з нативної тканини такого підвищення рівня експресії не відбувається, що, ймовірно, вказує на вищий остеогенний потенціал ММСК, виділених із кріоконсервованої тканини плаценти (рис. 6).

Слід зазначити, що хондрогенне диференціювання відбувалося за умов утворення локального скупчення ММСК під час культивування в краплі, тоді як за індукції культури клітин у моношарі рівень експресії мРНК гена колагену 2-го типу (*COL2A1*) не зростав.

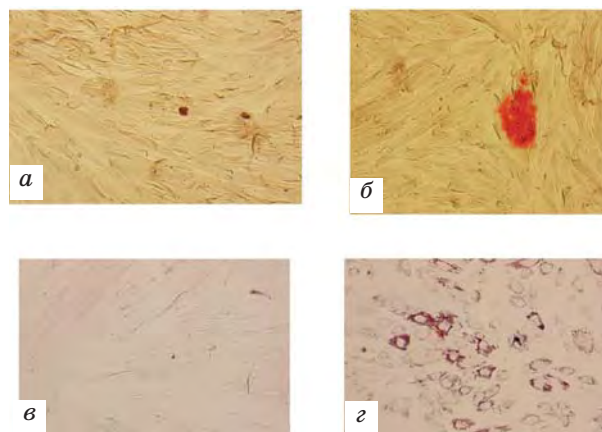


Рис. 5. Препарати культур стромальних клітин плаценти на 3-му пасажі:

21-ша доба культивування без факторів диференціювання (а, в) і в присутності факторів остеогенного (б) та адипогенного (г) диференціювання; а, б — фарбування Oil Red O; в, г — фарбування Alizarin Red S.  $\times 100$

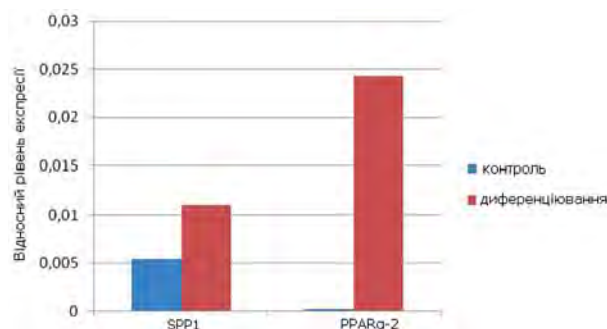
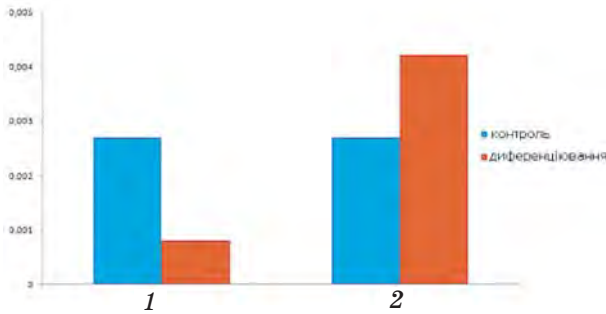


Рис. 6. Рівень експресії генів *SPP1* і *PPAR-gamma-2* в ММСК кріоконсервованої плаценти: індукція в остеогенному та адипогенному напрямках диференціювання (порівняно з контролем)



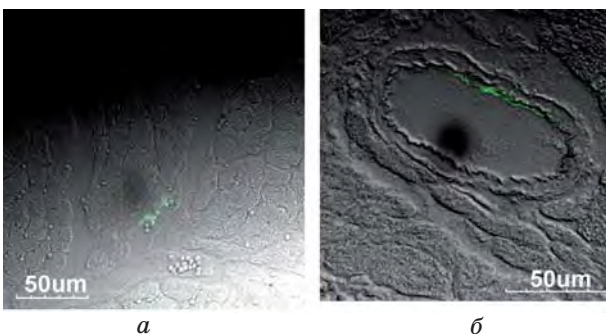
**Рис. 7. Рівень експресії гена COL2A1 в ММСК кріоконсервованої плаценти:** індукція хондрогенного диференціювання у процесі утворення клітинами моношару (1) та агрегату (2) порівняно з контролем

#### Дослідження міграційного потенціалу клітин *in vivo*, виділених із плаценти в присутності сироватки людини

На 28-му добу (49-та доба моделювання кардіоміопатії) після трансплантації клітин, виділених із плаценти у процесі культивування в присутності сироватки людини, за допомогою імуногістохімічного аналізу виявлено присутність донорських клітин у стінках судин та тканини серця мишей (рис. 8).

Таким чином, можна стверджувати, що плацентарні клітини здатні мігрувати і заселяти ушкоджену тканину, локалізуючись головним чином біля кровеносних судин.

Показано, що цитотрофобласт має здатність до інтеграції та диференціювання в ендотеліальні клітини і слугує основним джерелом неоангіогенезу в матці під час вагітності. Також встановлено, що клітини плода можуть вбудовуватись у судини різних тканин матері, особливо при запальних процесах [21]. Ці результати відповідають



**Рис. 8. Гістологічний препарат тканини серця мишей на 28-му добу після трансплантації клітин, отриманих під час культивування тканини плаценти в присутності сироватки людини:**

*a, б* — мітохондрії плацентарних клітин людини (зелений колір); комбінація флуоресцентної мікроскопії та фазового контрасту

нашим гістологічним даним, які свідчать, що трансплантовані клітини, виділені в присутності сироватки людини з тканини плаценти, більшою мірою локалізуються в стінках судин міокарда.

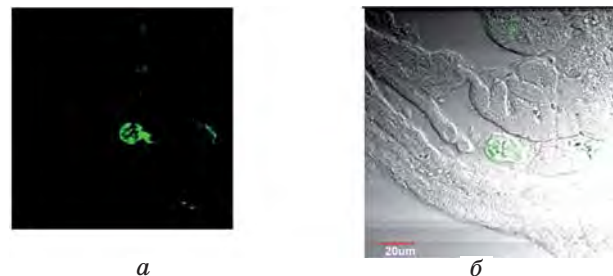
#### Дослідження міграційного потенціалу *in vivo* ММСК нативної та кріоконсервованої плаценти

Методом проточної цитометрії встановлено, що після трансплантації ММСК, які отримані з нативної та кріоконсервованої тканини плаценти, відносна кількість клітин людини в міокарді миші становила через 48 год  $0,0025\% \pm 0,0004$  ( $n = 3$ ) та  $0,004\% \pm 0,0009$  ( $n = 3$ ) відповідно ( $P < 0,05$ ), на 28-му добу —  $0,0056\% \pm 0,0021$  ( $n = 2$ ) та  $0,0036\% \pm 0,0020$  ( $n = 3$ ) відповідно.

Імуногістохімічне дослідження показало присутність клітин людини в судинах на препараті міокарда мишей через 48 год після трансплантації ММСК, отриманих із кріоконсервованої тканини плаценти людини (рис. 9).

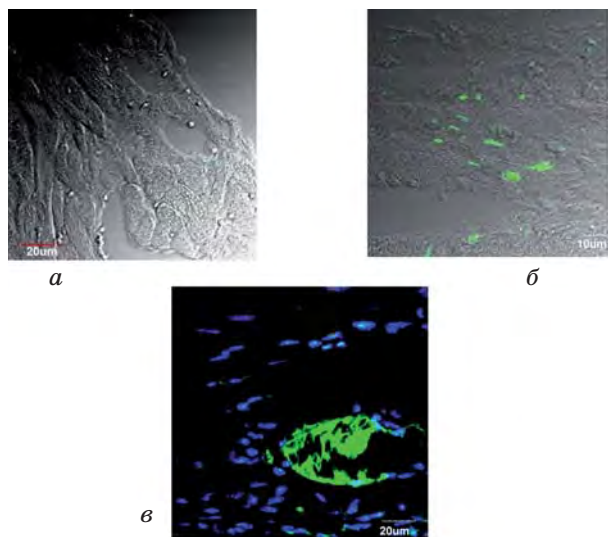
Імуногістохімічним методом виявлено мітохондрії людини в зразках міокарда тварин через 4 тижні після трансплантації клітин, одержаних із нативної та кріоконсервованої тканини плаценти (рис. 10). Такий метод виявлення клітин людини при ксено-трансплантаціях використовують у багатьох дослідженнях [22–24].

Слід зазначити, що ступінь химеризму тканини міокарда мишей під час трансплантації клітин плаценти людини відповідає даним, отриманим групою дослідників, які проводили трансплантацію ММСК плаценти імунодефіцитним мишам лінії SCID/ NUD [25], гемопоетичних клітин та ММСК плаценти *in utero* [13]. Також описано тропність плацентарних ММСК до судин та їхній



**Рис. 9. Гістологічний препарат міокарда миші на 48-му год після трансплантації ММСК з кріоконсервованої тканини плаценти:** мітохондрії ММСК (зелений колір) людини; *a* — флуоресцентна мікроскопія; *б* — комбінація флуоресцентної мікроскопії та фазового контрасту





**Рис. 10.** Гістологічний препарат міокарда миші на 28-му добу після трансплантації плацентарних ММСК людини:

*a* — мітохондрії ММСК (зелений колір) з нативної тканини плаценти; *б, в* — мітохондрії ММСК (зелений колір) з кріоконсервованої тканини плаценти та ядра клітин міокарда (*в*, синій колір); *а, б* — комбінація флуоресцентної мікроскопії та фазового контрасту; *в* — флуоресцентна мікроскопія

ендотеліальний потенціал *in vitro* й *in vivo* [26]. Здатність плацентарних ММСК до диференціювання в кардіоміоцити було показано в роботі [27].

Таким чином, культура плацентарних ММСК містить популяцію клітин, що несуть маркери епітелію та мезенхіми і за своїм імунофенотипом споріднені з плацентарним

епітелієм. ММСК, отримані з нативної та кріоконсервованої тканини плаценти людини, мають схожу морфологію, імунофенотип та здатність до диференціювання. Клітини, які мігрують з тканини плаценти під час культивування в присутності сироватки людини, схожі за імунофенотипом до ММСК. Усі ці типи клітин здатні до заселення ушкодженої серцевої тканини *in vivo*. Імуногістохімічним аналізом міокарда мишей встановлено, що більша частина виявлених донорських клітин, отриманих як з нативної, так і з кріоконсервованої тканини плаценти, локалізуються біля судин міокарда, що також може свідчити про їх функціональну подібність.

Отже, в результаті проведеної роботи встановлено, що ММСК з кріоконсервованої тканини плаценти людини мають схожу морфологію, імунофенотип та здатність до мультипотентного диференціювання з ММСК нативної тканини. Уперше показано, що плацентарні ММСК мають ознаки мезенхімальних та епітеліальних клітин, містять популяції подвійно позитивних клітин на цитокератин 7 і віментин, цитокератин 7 та CD90. Клітини, виділені з тканини плаценти у процесі культивування в присутності сироватки людини, утворюють популяцію адгезивних клітин, подібних за імунофенотипом до ММСК. Клітини, які мігрують з тканини плаценти під час культивування в присутності сироватки людини, ММСК, що виділені з нативної та кріоконсервованої плаценти, здатні до заселення ушкодженої серцевої тканини *in vivo*.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Parolini O., Alviano F., Bagnara G. P. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells // *Stem Cells*. — 2008. — V. 26. — P. 300–311.
2. Safety of Intramuscular Injection of Allogeneic PLX-PAD Cells for the Treatment of Critical Limb Ischemia [Електронний ресурс] /інтернет-портал «ClinicalTrials.gov», Identifier: NCT00919958, 2012. — Режим доступу: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00919958?term=limb+ischemia+Pluristem&rank=1>.
3. Brooke G., Rossetti T., Pelekanos R. et al. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials // *Brit. J. Haematol.* — 2008. — V. 144. — P. 571–579.
4. Serikov V., Hounshell C., Larkin S. et al. Human Term Placenta as a Source of Hematopoietic Cells // *Exp. Biol. Med.* — V. 2009. — N 234. — P. 813–823.
5. Prokopyuk O. S., Prokopyuk V. Yu., Volina V. V., Chizhevsky V. V. Cryopreservation effect on morphofunctional integrity of human placental tissue // Abstract of 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology CRYO-2010, Bristol, UK, 17–20 July 2010. — P. 77.
6. Пат. UA 67620. Спосіб виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин / Лобинцева Г. С., Шаблій В. А., Кучма М. Д. — Заявл. 30.09.2011; Опубл. 27.02.2012, Бюл. № 4.
7. Kara R. J., Bolli P., Karakikes I. et al. Fetal cells traffic to injured maternal myocardium and undergo cardiac differentiation // *Circ. Res.* — 2012. — V. 110. — P. 82–93.

8. Пат. UA 46673 А. Спосіб консервування гемопоетичних клітин людини/ Лобинцева Г. С. — Заявл. 14.01.2002; Опубл. 15.05.2002, Бюл. №5.
9. Spitalieri P., Cortese G., Pietropolli A. et al. Identification of Multipotent Cytotrophoblast Cells from Human First Trimester Chorionic Villi // *Clon. Stem Cells*. — 2009. — V. 11, N 4. — P. 535–556.
10. Sato Y., Fujiwara H., Zeng B.-X. et al. Platelet-derived soluble factors induce human extravillous trophoblast migration and differentiation: platelets are a possible regulator of trophoblast infiltration into maternal spiral arteries // *Blood*. — 2005. — V. 106, N 2. — P. 428–435.
11. Hannan N. J., Jones R. L., White C. A. et al. The Chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, Promote Human Trophoblast Migration at the Feto-Maternal Interface // *Biol. Reprod.* — 2006. — V. 74. — P. 896–904.
12. Abell A. N., Granger D. A., Johnson N. L. et al. Trophoblast Stem Cell Maintenance by Fibroblast Growth Factor 4 Requires MEKK4 Activation of Jun N-Terminal Kinase // *Mol. Cell. Biol.* — 2009. — V. 29, N 10. — P. 2748–2761.
13. Abell A. N., Vincent J. N., Huang W. et al. MAP3K4/CBP-Regulated H2B Acetylation Controls Epithelial-Mesenchymal Transition in Trophoblast Stem Cells // *Cell Stem Cell*. — 2011. — V. 8. — P. 525–537.
14. Shablii V., Kuchma M., Kyryk V. et al. Characteristics of hematopoietic and mesenchymal stem cells isolated from cryopreserved human placental tissue // ISSCR, 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Yokohama, Japan, June 13–16, 2012. — P. 95.
15. Шаблій В. А., Кучма М. Д., Кирик В. М. и др. Крיוконсервирование ткани плаценты человека — источник гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // *Кл. трансплант. ткан. инж.* — 2012. — Т. 7, № 1. — С. 54–62.
16. König J. Endothelial differentiation potential of amnion-derived mesenchymal stromal cells, 2011.
17. Wehrum M. J., Buhimsch I. A., Salafia C. et al. Accreta complicating complete placenta previa is characterized by reduced systemic levels of vascular endothelial growth factor and epithelial-to-mesenchymal transition of the invasive trophoblast // *Am. J. Obstet Gynecol.* — 2011. — V. 204, N 5. — P. 411.e1–411.e11.
18. Aboagye-Mathiesen G., Laugesen J., Zdravkovic M., Ebbesen P. Isolation and Characterization of Human Placental Trophoblast Subpopulations from First-Trimester Chorionic Villi // *Clin. Diagn. Lab. Immun.* — 1996. — V. 3 (1). — P. 14–22.
19. Battula V. L., Evans K. W., Hollier B. G. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition-Derived Cells Exhibit Multilineage Differentiation Potential Similar to Mesenchymal Stem Cells // *Stem Cells*. — 2010. — V. 28. — P. 1435–1445.
20. Chen C.-P., Liu S.-H., Huang, J.-P. et al. Engraftment potential of human placenta-derived mesenchymal stem cells after in utero transplantation in rats // *Hum. Reprod.* — 2009. — V. 24, N 1. — P. 154–165.
21. Huu S. N., Oster M., Uzan S. et al. Maternal neoangiogenesis during pregnancy partly derives from fetal endothelial progenitor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2007. — V. 104, N 6. — P. 1871–1876.
22. Sheth R. N., Manzano G., Li X., Levi A. D. Transplantation of human bone marrow-derived stromal cells into the contused spinal cord of nude rats // *J. Neurosurg. Spine*. — 2008. — V. 8, N 2. — P. 153–162.
23. Walczak P., Chen N., Eve D. et al. Long-term cultured human umbilical cord neural-like cells transplanted into the striatum of NOD SCID mice // *Brain Res. Bull.* — 2007. — V. 14, N 74 (1–3). — P. 155–163.
24. Hwang D. H., Kim B. G., Kim E. J. et al. Transplantation of human neural stem cells transduced with Olig2 transcription factor improves locomotor recovery and enhances myelination in the white matter of rat spinal cord following contusive injury // *BMC Neurosci.* — 2009. — V. 10. — P. 16 p.
25. Lee R. H., Pulin A. A., Seo M. J. et al. Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6 // *Cell Stem Cell*. — 2009. — V. 5. — P. 54–63.
26. Lee M. Y., Huang J. P., Chen Y. Y. et al. Angiogenesis in Differentiated Placental Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Is Dependent on Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  // *PLoS ONE*. — 2009. — V. 4 (10). — P. 1–2.
27. Ventura C., Cantoni S., Bianchi F. et al. Hyaluronan Mixed Esters of Butyric and Retinoic Acid Drive Cardiac and Endothelial Fate in Term Placenta Human Mesenchymal Stem Cells and Enhance Cardiac Repair in Infarcted Rat Hearts // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282 (19). — P. 14243–14257.

**ФЕНОТИП И МИГРАЦИОННЫЙ  
ПОТЕНЦИАЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ  
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ  
КЛЕТОК ИЗ НАТИВНОЙ  
И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ  
ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА**

В. А. Шаблій<sup>1,2</sup>, М. Д. Кучма<sup>1,2</sup>, В. М. Кирик<sup>3</sup>,  
А. Н. Онищенко<sup>2</sup>, О. М. Цупиков<sup>3</sup>,  
П. П. Клименко<sup>3</sup>, П. А. Арешков<sup>1</sup>,  
О. В. Кучук<sup>3</sup>, Л. Л. Лукаш<sup>1</sup>, Г. С. Лобынцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт клеточной терапии, Киев

<sup>3</sup>ГУ «Институт генетической и регенеративной  
медицины НАМН Украины», Киев

*E-mail: v\_shabliy@ukr.net*

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки плацентарного происхождения используют для лечения критической ишемии нижних конечностей, дилатационной кардиомиопатии и восстановления кровотока после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Поэтому актуальными задачами являются разработка методов криоконсервирования ткани плаценты, выделение из нее мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, изучение их молекулярно-биологических свойств, способности к мультилинейной дифференцировке и регенеративного потенциала. В работе показано, что такие клетки, выделенные из нативной и криоконсервированной ткани плаценты человека, имеют сходную морфологию, иммунофенотип и способность к мультилинейной дифференцировке. Впервые установлено, что плацентарные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки имеют признаки мезенхимных и эпителиальных клеток, содержат популяции цитокератин 7-положительных клеток, экспрессирующих виментин и CD90. Нами были выделены клетки, мигрирующие из ткани плаценты при культивировании в присутствии сыворотки человека, которые сходны по иммунофенотипу с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками. Эти мультипотентные мезенхимные стромальные клетки способны к заселению поврежденной сердечной ткани *in vivo*.

**Ключевые слова:** плацента, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, криоконсервирование, кардиомиопатия, миокард.

**PHENOTYPE AND MIGRATION  
POTENTIAL OF MULTIPOTENT  
MESENCHYMAL STROMAL CELLS  
FROM NATIVE AND CRYOPRESERVED  
HUMAN PLACENTA**

V. A. Shabliy<sup>1,2</sup>, M. D. Kuchma<sup>1,2</sup>, V. M. Kyryk<sup>3</sup>,  
G. M. Onishchenko<sup>2</sup>, O. M. Tsupykov<sup>3</sup>,  
P. P. Klymenko<sup>3</sup>, P. O. Areshkov<sup>1</sup>, O. V. Kuchuk<sup>3</sup>,  
L. L. Lukash<sup>1</sup>, G. S. Lobyntseva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics  
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>Institute of Cell Therapy, Kyiv

<sup>3</sup>State Institute of Genetic and Regenerative  
Medicine of National Academy of Medical  
Science of Ukraine, Kyiv

*E-mail: v\_shabliy@ukr.net*

Multipotent mesenchymal stromal cells of placental origin are used to treat critical limb ischemia, dilated cardiomyopathy, and hematopoiesis recovery after transplantation of hematopoietic stem cells. Therefore development of the methods of placental tissue cryopreservation and isolation of placental-derived multipotent mesenchymal stromal cells and the study of their molecular-biological properties and capacity to multilineage differentiation and regenerative potential is an actual task. It was shown that multipotent mesenchymal stromal cells excreted from native and cryopreserved human placenta tissue had similar morphology, immunophenotype and multilineage differentiation capacity. For the first time, it was established that placental multipotent mesenchymal stromal cells expressed mesenchymal and epithelial cells markers, contained of cytokeratin 7-positive cells that expressed vimentin and CD90. We isolated the cells that migrated from the placental tissue during culturing in cell culture medium with human serum that were similar in immunophenotype to the multipotent mesenchymal stromal cells. These multipotent mesenchymal stromal cells, isolated from native and cryopreserved placental, were able to survive homing and integrating into damage cardiac tissue of mice *in vivo*.

**Key words:** placenta, multipotent mesenchymal stromal cells, cryopreservation, cardiomyopathy, myocardium.