

**Мезенхимальные стромальные клетки из нативной  
и криоконсервированной плаценты человека:  
фенотип, мультипотентность и миграционный потенциал *in vivo*<sup>#</sup>**

UDC 611.013.85.085.23

V. SHABLIY<sup>1,2\*</sup>, M. KUCHMA<sup>1,2</sup>, V. KYRYK<sup>3</sup>, G. ONISHCHENKO<sup>2</sup>, O. TSUPYKOV<sup>3</sup>, P. KLYMENKO<sup>3</sup>,  
O. KUCHUK<sup>3</sup>, A. GABRIELIAN<sup>4</sup>, T. DOMANSKIY<sup>4</sup>, V. ONISHCHENKO<sup>4</sup>, L. LUKASH<sup>1</sup>, G. LOBYNTSEVA<sup>2</sup>**Mesenchymal Stromal Cells from Native and Cryopreserved Human Placenta:  
Phenotype, Multipotency and *In Vivo* Migration Potential<sup>#</sup>**

Сегодня плацента человека используется как источник стволовых клеток для регенеративной медицины [6]. Однако остается много не изученных вопросов, касающихся свойств этих клеток, их происхождения и регенеративного потенциала. Не разработаны методы сохранения ткани плаценты, необходимые для проведения инфекционного скрининга, проверки на стерильность и гистосовместимость. Данное исследование посвящено изучению свойств мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), полученных из нативной и криоконсервированной ткани плаценты.

Плаценту человека получали после физиологических родов или кесарева сечения. Ткань плаценты криоконсервировали под защитой 10% диметилсульфоксида (ДМСО). Культуры стромальных клеток нативной и криоконсервированной ткани плаценты получали методом ферментации в течение 30 мин в растворе 0,1% коллагеназы I и 0,6 ед/мл диспазы, культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, проверяли на мультипотентность в индукционных средах, анализировали методом проточной цитометрии на лазерном проточном цитофлуориметре-сортере «FACS Aria» («Becton Dickinson», США) и методом иммуноцитохимии как описано ранее [3]. Экспрессию генов определяли методами ПЦР и ПЦР в реальном времени. Стромальные клетки, полученные из натив-

Nowadays human placenta has been used as a source of stem cells for regenerative medicine [6]. However, many tasks relative to properties, origin and regenerative potential of these cells have been remained unstudied. There are no methods developed for preservation of human placenta required for infectious screening, tests for sterility and histocompatibility. This research was devoted to the study of properties of multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) derived from native and cryopreserved placental tissue.

Human placenta was derived after delivery or Caesarian surgery. Placenta tissue was cryopreserved under protection of 10% dimethyl sulfoxide. Stromal cell cultures from native and cryopreserved placenta tissue were derived by treatment during 30 min in solution of 0.1% collagenase I and 0.6 units/ml of dispase, cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, tested for multipotency in induced media, analyzed by flow cytometry with FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson, USA) and immunocytochemistry as described earlier [3]. Gene expression was established by PCR and real-time PCR. Stromal cell isolated from native placenta were then cryopreserved under protection of 5% dimethyl sulfoxide. Cardiac failure in FVB mice was induced by isoproterenol, and to the 21<sup>st</sup> day thereafter the transplantation of MMSCs from frozen-thawed placenta and frozen-thawed MMSCs from placenta was performed. Histological,

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

<sup>2</sup>ООО «Институт клеточной терапии», Киев

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

<sup>4</sup>Национальный институт хирургии и трансплантологии им. А.А. Шалимова, Киев

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Комарова, 3, г. Киев 03680; электронная почта: v\_shabliy@ukr.net

<sup>#</sup>Данное исследование было представлено на мини-симпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 22 мая 2012 года в г. Харькове.

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

<sup>2</sup>Institute of Cell Therapy, Kiev, Ukraine

<sup>3</sup>State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

<sup>4</sup>A.A. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed: 3, Komarova str., Kyiv 03680, Ukraine; e-mail: v\_shabliy@ukr.net

<sup>#</sup>This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22<sup>nd</sup> of May, 2012.

ной плаценты криоконсервировали под защитой 5% ДМСО. Сердечную недостаточность у мышей линии FVB индуцировали изопротеренолом, после чего на 21-е сутки проводили трансплантацию ММСК, полученных из криоконсервированной ткани плаценты и криоконсервированных ММСК из ткани плаценты. Гистологические, иммуногистохимические и FACS анализы мышечных сердец были проведены на 2-е и 28-е сутки после трансплантации клеток. Статистическую обработку проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Для ММСК, выделенных из нативной и криоконсервированной ткани плаценты человека, были характерны иммунофенотип  $CD90^+CD73^+CD105^+HLA-ABC^{low}CD34^-CD45^-CD133^-CD14^-$  и способность к направленной дифференцировке в остео- и адипогенном направлениях, что проявлялось в способности культуры образовывать минерализованный матрикс и жировые включения (рис. 1) [1].

В культуре ММСК плаценты была обнаружена популяция клеток, положительных на виментин и цитокератин 7 (рис. 2, А, В), что также показано для ММСК амниотической оболочки [5]. Присутствие популяции цитокератин 7 и CD90 положительных клеток, выделенных из нативной и криоконсервированной ткани плаценты (рис. 2, В), указывает на возможное возникновение этой популяции вследствие эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток трофобласта [4].

По данным иммуноцитохимического анализа показано достоверное уменьшение количества клеток, позитивных по цитокератину 7, в течение трех пассажей с 37,6 (26,6–49,4%,  $n = 6$ ,  $p \leq 0,05$ ) до 13% (2,5–31,1%,  $n = 6$ ,  $p \leq 0,05$ ) в культуре клеток ММСК нативной плаценты. Выявлен уровень химеризма клеток матери 0,85% (0–3,  $n = 4$ ) в культурах клеток ММСК плаценты. В ММСК, полученных из нативной ткани плаценты, установлена экспрессия генов транскрипционных факторов, характерных для эмбриональных и сердечных стволовых клеток ОСТ-4 и NKX2-5, тогда как в ММСК из криоконсервированной ткани – только ОСТ-4.

Анализ методами проточной цитофлуориметрии и иммуногистохимии показал наличие

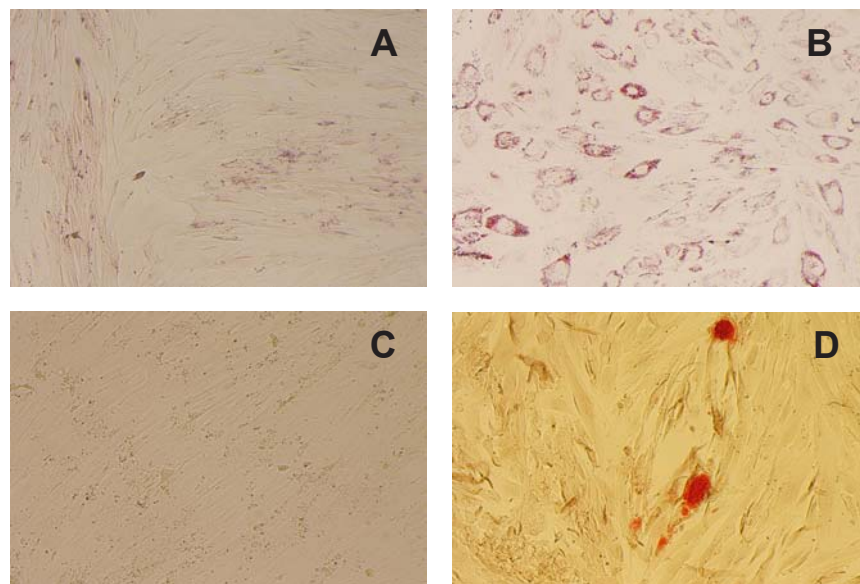
immunohistochemical and FACS analyses of murine hearts were performed by the 2<sup>nd</sup> and 28<sup>th</sup> days after cell transplantation.

Statistical processing was carried-out with Mann-Whitney U-criterion.

Immunophenotype  $CD90^+CD73^+CD105^+HLA-ABC^{low}CD34^-CD45^-CD133^-CD14^-$  and capability of differentiation into osteo- and adipogenic directions manifested in culture ability to form mineralized matrix and adipose inclusions are characteristic for MMSCs derived from native and cryopreserved human placental tissue (Fig.1) [1].

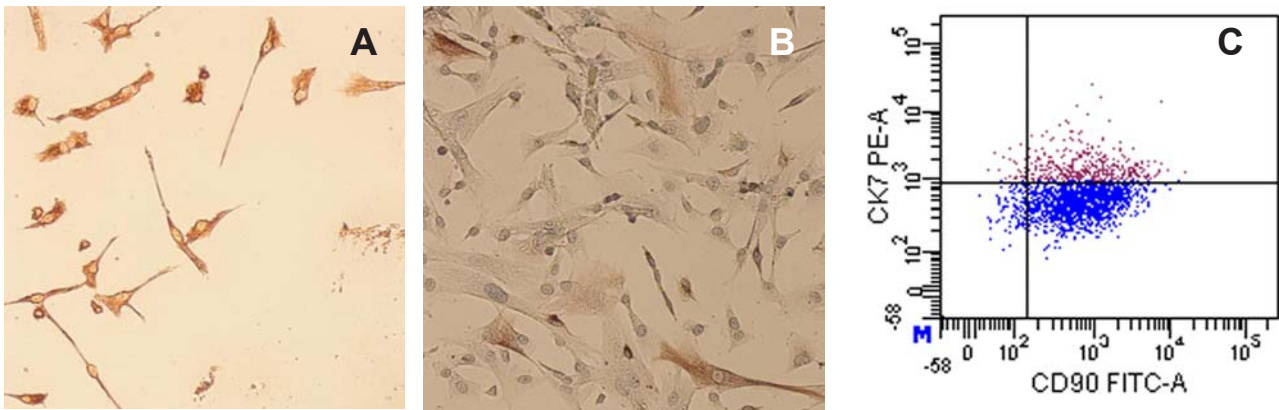
The culture of placental MMSCs contained the population of cells positive for vimentin and cytokeratin 7 (Fig. 2A, B) that was also shown for MMSCs of amniotic membrane [5]. The presence of population of cytokeratin 7 and CD90 positive cells derived from native and cryopreserved placental tissue (Fig. 2C) pointed to possible way of this population appearance, viz. due to epithelial to mesenchymal transformation of trophoblasts [4].

According to the data of immunocytochemical analysis it was shown a significant reduction of number of cells positive for cytokeratin 7 during 3 passages from 37.6 (26.6–49.4%,  $n = 6$ ,  $p \leq 0.05$ ) down to 13% (2.5–31.1%,  $n = 6$ ,  $p \leq 0.05$ ) in culture of MMSCs of native placenta. Chimerism rate of maternal cells in cultures of



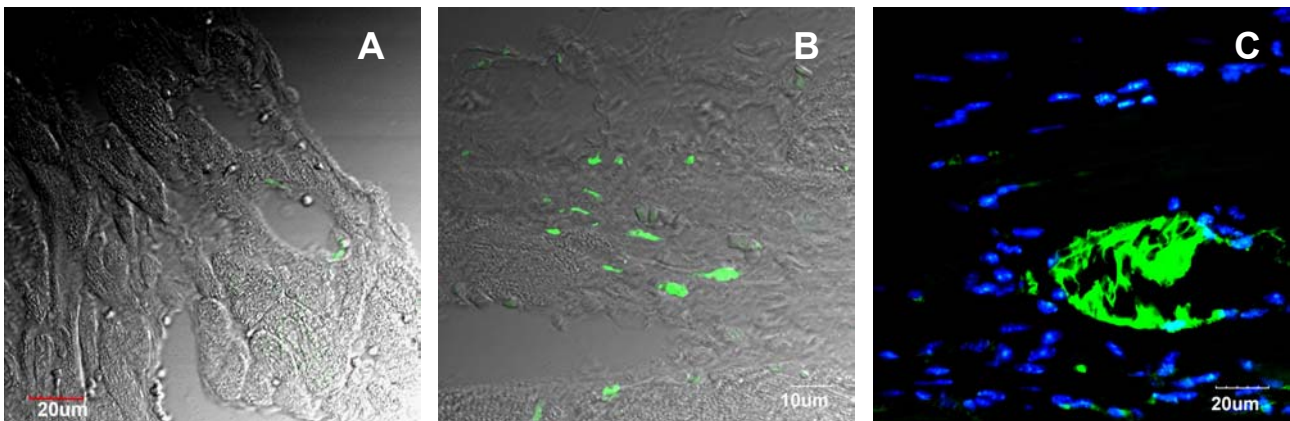
**Рис. 1.** Препараты культур стромальных клеток плаценты, 3-й пассаж, 21-е сутки культивирования без факторов дифференцировки (А, С) и в присутствии факторов адипогенного (В) или остеогенного (D) дифференцирования, окраска Oil Red O (А, В) и Alizarin Red S (С, D).

**Fig. 1.** Preparations of placental stromal cell cultures, 3<sup>rd</sup> passage the 21<sup>st</sup> day of culturing with no differentiation factors (A, C) and in the presence of adipogenic (B) or osteogenic (D) differentiation factors, staining with Oil red O (A, B) and Alizarin Red S (C, D).



**Рис. 2.** Культура стромальных клеток плаценты: А – микропрепарат клеток, окрашенных на виментин; В – микропрепарат клеток, окрашенных на цитокератин 7,  $\times 50$ ; С – двухмерная гистограмма популяции клеток, положительных на цитокератин 7 и CD90.

**Fig. 2.** Culture of placental stromal cells: A – microassay of cells stained for vimentin; B – microassay of cells stained for cytokeratin 7;  $\times 50$ ; C – 2D histogram of population of cells positive for cytokeratin 7 and CD90.



**Рис. 3.** Препараты миокарда мыши, 4 недели после трансплантации ММСК плаценты, окраска на митохондрии человека; после трансплантации ММСК нативной (А) и криоконсервированной (В) ткани плаценты (комбинация флуоресцентной микроскопии и фазового контраста); С – после трансплантации ММСК криоконсервированной ткани плаценты), дополнительная окраска ядер клеток красителем Hoechst 33342 (флуоресцентная микроскопия).

**Fig. 3.** Murine myocardium 4 weeks after transplantation of placental MMSCs stained for human mitochondria after transplantation of MMSCs of native (A) and cryopreserved (B) placental tissue (merged images of fluorescent microscopy and phase contrast light microscopy); C – after transplantation of MMSCs from cryopreserved placental tissue, additional staining of cell nuclei with Hoechst 33342 dye (fluorescent microscopy).

ММСК, полученных из нативной и криоконсервированной плаценты, в ткани сердца мышей на 2 и 28-е сутки после трансплантации. Донорские клетки локализовались, главным образом в ткани миокарда возле сосудистых стенок (рис. 3).

Результаты гистологического анализа и электрокардиограмм показали значительное улучшение регенерации сердечной ткани после трансплантации ММСК [2].

В других работах авторами было установлено, что после трансплантации плацентарных ММСК мышам с моделью инфаркта миокарда значительно уменьшалась зона рубца, и донорские клетки преимущественно дифференцировались в эндотелиальном направлении [7].

ММСК of placenta was 0.85% (0–3,  $n = 4$ ). In MMSCs derived from native tissue of placenta we established expression of transcriptional factor genes characteristic for embryonic and cardiac stem cells OCT-4 and NKX2-5, whereas in MMSCs from cryopreserved tissue only OCT-4 was found.

Analysis by flow cytofluorimetry and immunohistochemistry showed the presence of MMSCs derived from native and cryopreserved placenta in cardiac tissue of mice by the 2<sup>nd</sup> and 28<sup>th</sup> days after transplantation. Donor cells were located mainly in myocardium tissue near vessel walls (Fig. 3).

The results of histological analysis and electrocardiograms showed a significant improvement of cardiac tissue regeneration after transplantation of MMSCs [2].

Таким образом, клетки, полученные из ткани плаценты человека, имеют иммунофенотипические и мультилинейные свойства, характерные для ММСК.

Основной уникальной особенностью плацентарных ММСК является наличие популяции клеток, одновременно положительных на виментин, цитокератин 7 и CD90.

Фенотипические ММСК, выделенных из нативной и криоконсервированной ткани плаценты, одинаковы. Кроме того, они способны мигрировать и заселять поврежденную ткань миокарда на модели кардиомиопатии у мышей. Клетки из нативной ткани в отличие от криоконсервированной экспрессируют не только OCT-4, но и NKX2-5.

### Литература

1. Шаблій В.А., Кучма М.Д., Кирик В.М. та ін. Вплив мезенхімальних стромальних клітин з нативної та криоконсервованої плаценти людини на деякі морфофункціональні особливості міокарда у мишей з кардіоміопатією // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13, №10. – С. 133–138.
2. Шаблій В.А., Кучма М.Д., Кирик В.М. и др. Криоконсервирование ткани плаценты человека как источника гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // КТТИ. – 2012. – Т. VII, №1. – С. 54–62.
3. Патент UA 67620 Спосіб виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин / Г.С. Лобинцева, В.А. Шаблій, М.Д. Кучма. – Заявл. 30.09.2011; Опубл. 27.02.2012. – Бюл. №4.
4. 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. – Vol. 28, №8. – P. 1435–1445.
5. Koenig J., Huppertz B., Dohr G. et al. Amnionic mesenchymal stromal cells (AMSC) show a mesenchymal-epithelial phenotype and adopt endothelial characteristics under angiogenic conditions // EMBO Workshop IPLASS. – 2010. – P. 76.
6. 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. – Vol. 26, №2. – P. 300–311.
7. 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. – Vol. 282, №19. – P. 14243–14257.

Поступила 01.06.2012

It has been found recently by C. Ventura *et al.* that trans-plantation of placental MMSCs into mice with myocardial infraction resulted in a significant decrease of cicatrix zone and predominant differentiation of donor cells towards endothelial direction [7].

Thus, it can be concluded that the cells derived from human placental tissue have immunophenotypic and multilinear properties characteristic for MMSCs.

A primary unique peculiarity of placental MMSCs is the presence of cell population simultaneously positive for vimentin, cytokeratin 7 and CD90.

Phenotypic characteristics of MMSCs derived from native and cryopreserved placental tissue are equal, these cells are able to migrate and repopulate the damaged myocardium tissue in mice with cardiomyopathy. MMSCs from native tissue unlike cryopreserved one express not only OCT-4, but NKX2-5 as well.

### References

1. Shabliy V.A., Kuchma M.D., Kirik V.M. et al. Effect of mesenchymal stromal cells from native and cryopreserved human placenta on some morphofunctional peculiarities of miocardium in mice with cardiomyopathy // Vestnik neotlozhnoy i vosstanovitelnoy meditsiny. – 2012. – Vol. 13, N1. – P. 133–138.
2. Shabliy V.A., Kuchma M.D., Kirik V.M. et al. Cryopreserved tissues of human placenta as a source of hemopoietic progenitor cells and multipotent mesenchymal stromal cells // Cell Transplantation and Tissue Engineering. – 2012. – N1. – P. 54–62.
3. Patent UA 67620. Method of derivation of mesenchymal stromal cells / G.S. Lobynitseva, V.A. Shabliy, M.D. Kuchma; Applied 30.09.11; Publ. 27.02.12. – Bul. N7.
4. 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. – Vol. 28, N8. – P. 1435–1445.
5. Koenig J., Huppertz B., Dohr G. et al. Amnionic mesenchymal stromal cells (AMSC) show a mesenchymal-epithelial phenotype and adopt endothelial characteristics under angiogenic conditions // EMBO Workshop IPLASS. – 2010. – P. 76.
6. 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. – Vol. 26, N2. – P. 300–311.
7. 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. – Vol. 282, N19. – P. 14243–14257.

Accepted 01.06.2012