

# Сравнительная характеристика гемопоэтических прогениторных клеток, полученных из нативной и криоконсервированной ткани плаценты и пуповинной крови человека

М.Д. Кучма<sup>1,2</sup>, В.А. Шаблій<sup>1,2</sup>, В.М. Кирик<sup>3</sup>, А.Н. Онищенко<sup>2</sup>, Л.Л. Лукаш<sup>1</sup>, Г.С. Лобынцева<sup>2</sup>

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

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

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

## Comparative Characteristics of Hemopoietic Progenitor Cells Derived From Native and Cryopreserved Placental Tissue and Human Cord Blood

M.D. KUCHMA<sup>1,2</sup>, V.A. SHABLIY<sup>1,2</sup>, V.M. KIRIK<sup>3</sup>, A.N. ONISCHENKO<sup>2</sup>, L.L. LUKASH<sup>1</sup>, G.S. LOBYNTSEVA<sup>2</sup>

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

В последнее время было установлено, что плацента играет важную роль в фетальном гемопоэзе. Было показано, что гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) мигрируют в аллантаис еще до образования хориоаллантаиса. Количество ГСК в плаценте в несколько раз выше, чем в фетальной печени и области аорты, гонад и мезонефроса. Цель данной работы – показать возможность получения жизнеспособных гемопоэтических прогениторных клеток (ГПК) из нативной и криоконсервированной плаценты и провести сравнительный фенотипический анализ с ГПК, выделенных из ткани и пуповинной крови.

Криоконсервирование ткани плаценты осуществляли по специально разработанной программе замораживания. Выделенные ферментативно клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием CD34, CD90, CD45, CD31, CD235, CD7, CD33 антител (BD, USA). При клональном анализе использовали культуральную среду «MethoCult» («StemCellTech», Канада).

По результатам FACS-анализа в плаценте присутствуют популяции клеток CD34<sup>low</sup>CD45<sup>low</sup> и CD34<sup>hi</sup>CD45<sup>low</sup>. Уровень экспрессии CD90 на ГПК из ткани плаценты статистически достоверно выше, чем на ГПК пуповинной крови, а именно 24,5% (6,2–49,8) и 2,2% (0,08–10,5) соответственно. ГПК из плацентарной ткани имели более высокий уровень экспрессии CD31 по сравнению с кордовой кровью. Анализ микропопуляций гемопоэтических клеток показал наличие в плаценте CD34<sup>+</sup>CD235<sup>+</sup>-клеток в количестве 0,28% (0,0001–1,1609), тогда как в пуповинной крови такой популяции не наблюдалось; процентное содержание CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>, полученных из ткани плаценты, достоверно выше, чем в кордовой крови: 0,10% (0,03–0,24) и 0,01% (0,01–0,12) соответственно; популяция с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD33<sup>dim</sup> составляла 0,58% (0,18–1,21) для плаценты и 0,13% (0,03–0,30) для пуповинной крови. При выделении из криоконсервированной плаценты в популяции CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup> присутствует больше SSC<sup>low</sup> клеток по сравнению с нативной тканью: 85,6% (68,9–96,5) и 60,8% (44,9–75,6) соответственно. Содержание ГПК(CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>SSC<sup>low</sup>) среди всех гемопоэтических клеток (CD45<sup>+</sup>) из нативной и криоконсервированной плаценты было около 1% (0,66% (0,36–1,05) и 1,11% (0,18–2,82) соответственно). При культивировании клеток, выделенных из нативной и криоконсервированной плаценты, наблюдался рост грануломоноцитарных, моноцитарных, гранулоцитарных и эритроидных колоний; соотношение разных типов колоний, образованных клетками плаценты и пуповинной крови, не отличался.

Recently the placenta was established to play an important role in fetal hemopoiesis. Hemopoietic stem cells (HSCs) were demonstrated as migrating into allantois even before chorio-allantois formation. A number of HSCs in placenta is several times higher than in fetal liver and the area of aorta, gonads and mesonephros. The research aim was to demonstrate the possibility of procurement of viable hemopoietic progenitor cells (HPCs) from native and cryopreserved placenta and perform a comparative phenotypic analysis with HPCs, isolated from tissue and cord blood.

Placental tissue cryopreservation was carried-out by the specially designed program of freezing. The cells, isolated in an enzymatic way were analyzed by the flow cytometry method using CD34, CD90, CD45, CD31, CD235, CD7, CD33 antibodies (BD, USA). In clonal analysis we used the culture medium MethoCult (StemCell Tech., Canada).

According to the results of FACS-analysis the placenta contains the populations of cells CD34<sup>low</sup>CD45<sup>low</sup>CD34<sup>hi</sup>CD45<sup>low</sup>. The level of CD90 expression on HPCs of placental tissue was statistically and significantly higher than on cord blood HPCs, that was 24.5% (6.2–49.8) and 2.2% (0.08–10.5), correspondingly. The HPCs from placental tissue had a higher level of CD31 expression compared to cord blood ones. The analysis of hemopoietic cell micropopulations showed the presence in placenta of CD34<sup>+</sup>CD235<sup>+</sup> cells in the amount of 0.28% (0.0001–1.1609), while in cord blood this population was not observed, the percentage of CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup> cells, derived from placental tissue was statistically and significantly higher than in cord blood: 0.10% (0.03–0.24) and 0.01% (0.01–0.12), respectively; a population with CD34<sup>+</sup>CD33<sup>dim</sup> phenotype comprised 0.58% (0.18–1.21) for placenta and 0.13% (0.03–0.30) for cord blood. Isolation from cryopreserved placenta resulted in presence of higher content of SSC<sup>low</sup> cells in CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup> population compared to a native tissue: 85.6% (68.9–96.5) and 60.8% (44.9–75.6), respectively. The HPCs content (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>SSC<sup>low</sup>) among all the hemopoietic cells (CD45<sup>+</sup>) in native and cryopreserved placenta was about 1% (0.66% (0.36–1.05) and 1.11% (0.18–2.82), correspondingly. When culturing cells, isolated from native and cryopreserved placenta, there was observed a growth of granulo-monocytic, monocytic, granulocytic and erythroid colonies, the ratio of different types of colonies, formed by cells of placenta and umbilical blood did not differ.