

ФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРИ КЛІТИН, ОДЕРЖАНИХ ІЗ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ТКАНИНИ ХОРІОНА

В. А. Шаблій^{1,2}

М. Д. Кучма²

В. М. Кирик³

Л. Л. Лукаш¹

Г. С. Лобінцева²

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²ТОВ «Інститут клітинної терапії»,

³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України»

E-mail: lukash@imbg.org.ua

Отримано 07.07.2011

У роботі показано можливість отримання культур клітин з кріоконсервованої тканини хоріона з використанням 1,5 М ДМСО. Уперше описано особливості формування культури клітин кріоконсервованої тканини хоріона людини та її імунофенотип. Встановлено характер експресії маркера CD90 в культурах клітин, одержаних з кріоконсервованої тканини хоріона. Зниження рівня експресії маркерів CD90 та CD105 спостерігається одночасно з падінням проліферативної активності та набуттям клітинами багатоядерності. Показано присутність популяції ендотеліальних прогеніторних клітин у культурі клітин хоріона людини на першому пасажі. Виявлено експресію цитокератину в популяціях клітин, одержаних з нативного та кріоконсервованого хоріона.

Ключові слова: хоріон, кріоконсервування, культура клітин, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини.

Упродовж останніх років плацента є об'єктом інтенсивного вивчення як цінне джерело стовбурових клітин. З хоріона та амніона було виділено мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), які зараз широко використовують у регенеративній медицині. Плацентарний комплекс містить також низку інших мультипотентних клітин (гемопоетичних прогеніторних, епітеліальних мультипотентних тощо), які вже широко вивчають у доклінічних дослідженнях. Плацента відповідає одній з основних вимог до джерела стовбурових клітин, забезпечуючи можливість отримання великої кількості клітин без інвазивних втручань [1].

Розроблення технології кріоконсервування тканини плаценти дасть змогу оцінити джерело мультипотентних клітин на присутність мікробної та вірусної контамінації і планувати процес одержання клітинного препарату відповідно до потреби у його використанні. Запропонований підхід дасть можливість значною мірою знизити витрати, пов'язані із застосуванням мультипотентних клітин у клінічній практиці.

Технологія низькотемпературного кріоконсервування є одним з основних методів, які уможливають стандартизацію технології отримання клітинного продукту відповідно до стандартів GMP, GLP та GTP.

У багатьох роботах було показано можливість виділення ММСК з хоріона людини (плодів першого триместру вагітності). Ці клітини експресували маркери плюрипотентності і мали здатність підтримувати гемопоез *in vitro* [2, 3].

Однак, попри швидкі темпи розвитку досліджень у зазначеному науковому напрямі, ще й досі не розроблено методологію виділення ММСК з кріоконсервованої тканини плаценти, не описано їхні молекулярно-біологічні властивості, зокрема здатність до мультилінійного диференціювання. Не викликає сумнівів той факт, що пошук оптимальних умов кріоконсервування тканини плаценти та подальше отримання певних пулів стовбурових клітин є вкрай актуальним завданням як для наукових цілей, так і для практичного застосування.

Метою цієї роботи було встановити та порівняти морфологічні й імунофенотипові

характеристики клітин *in vitro*, виділені з нативного та кріоконсервованого хоріона людини.

Матеріали і методи

Метод кріоконсервування тканини хоріона

Для проведення досліджень тканину хоріона було взято з абортівного матеріалу людини 5–12 тижнів гестації, отриманого в результаті добровільного переривання вагітності, за інформованої згоди жінок. Дослідження було схвалено Координаційною радою з трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України. Жінок було обстежено на наявність вірусних та гемічних інфекцій (антитіла проти *Threponema pallidum*, HCV, HIV 1/2, HbsAg).

Тканину хоріона масою 1–3 г промивали в чашках Петрі діаметром 90 мм розчином Хенкса з додаванням 50 од/мл амфотерицину («Синтез»), 100 од/мл пеніциліну («Артеріум»), 50 мкг/мл стрептоміцину («Артеріум»). Тканину переносили в пробірки об'ємом 50 мл, додавали 2–3 мл розчину Хенкса та подрібнювали за допомогою ножиць на фрагменти не більше 3 мм. Фрагментовану тканину переносили в кріоампули і додавали кріопротектори до кінцевої концентрації: 1,5 М пропандіол, 1,5 М ДМСО, 0,7 М ДМСО.

Процес охолодження починали з 20 °С зі швидкістю 1 °С/хв до температури кристалізації, яка коливалася залежно від концентрації кріопротектора від –4 до –6 °С. На такій температурі зразки витримували протягом 10 хв і проводили ініціацію кристалізації. Після замерзання кріоконтейнери охолоджували зі швидкістю 0,3 °С/хв до –35 °С, потім з 5 °С/хв до –50 °С та з 10 °С/хв до –140 °С. За температури –140 °С процес охолодження в заморозувачі зупиняли й переносили матеріал у рідкий азот (–196 °С) на довгострокове зберігання.

Гістологічний метод дослідження тканини плаценти

Фрагменти нативної та кріоконсервованої тканини фіксували забуференим 10% -м розчином параформу і заливали в парафін за стандартним протоколом. Приготовлені зрізи фарбували гематоксиліном та еозином.

Отримання мезенхімальних клітин з тканин кріоконсервованого хоріона

Кріоконсервовану тканину розморозували на водяній бані при температурі

38–40 °С до появи рідкої фази з подальшим відтаванням за кімнатної температури. Вимивання ДМСО з тканини проводили, повільно додаючи розчин Хенкса (Sigma). До тканини додавали розчин нагрітих до 37 °С ензимів: 0,6 од/мл диспази (Gibco), 0,1% колагенази (Serva) у співвідношенні 1:2. Інкубували 10–20 хв при температурі 37 °С. Для зниження активності ензимів додавали фетальну сироватку телят (ФСТ) (Sigma) до кінцевої концентрації 10%. Отриману суспензію клітин піпетували декілька разів і фільтрували її через фільтр із діаметром пор 100 мкм. Одержаний фільтрат центрифугували 5 хв при 300 g. Супернатант відбирали, а осад клітин ресуспендували в фосфатно-сольовому розчині Дюльбеко (Gibco) кімнатної температури. Життєздатність клітин визначали методом фарбування 0,4% -м розчином трипанового синього (Sigma), як відсоток живих клітин на 200 підрахованих клітин. Кількість клітин у суспензії підраховували в камері Горяєва. Клітини висівали в культуральні флакони для адгезивних клітин *in vitro* з розрахунку 300–400 тис. клітин на 1 см². Середовище для культивування DMEM містило 15% ФСТ (Gibco), 5 мМ HEPES, 2 мМ L-глутаміну (Biomedicals), 50 мкг/мл стрептоміцину, 100 од/мл пеніциліну.

Культивування проводили при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂ зі зміною середовища кожні 3–4 доби. Пересів здійснювали з досягненням культурою 80–90% конфлюєнсу у співвідношенні 1:3. Для пересіву використовували 0,05% -й розчин трипсину з ЕДТА (Biobrom).

Імуноцитохімічне дослідження

Для проведення імуноцитохімічного аналізу клітини висівали в 4-лункові планшети з площею лунки 1,9 см² (NunclonTM Δ Surface), фіксували 10% -м розчином забуференого параформу. Ендогенну пероксидазну активність інгібували 0,3% -м розчином H₂O₂ протягом 5 хв. Перед внесенням антитіл фіксовані препарати обробляли 0,1% -м розчином тритона X-100. Для детекції маркерних протеїнів використовували антитіла панцитокератину (Dako, Данія). Візуалізацію імунних комплексів проводили із застосуванням Mouse/Rabbit PolyVue HPR/DAB Detection System (DBS, США).

Протокова цитофлуориметрія

Клітини знімали з культурального пластику 0,05% -м розчином трипсину з ЕДТА. До суспензії клітин додавали FBS (Gibco) до

кінцевої концентрації 10% та центрифугували при 250 g протягом 10 хв. Імунофенотипування суспензії клітин проводили методом протокової цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл, кон'югованих із флуорохромами (Becton Dickinson, США) в робочій концентрації 0,5 мкг на 10⁶ клітин: anti-CD34 APC, anti-CD90 FITC, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD105 PerCP-Cy 5.5, anti-CD73 PE, anti-CD14 Pacific Blue. Фенотипування здійснювали на лазерному протоковому цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) з програмним забезпеченням 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 з комбінацією кількох антитіл без одного з них (fluorescence minus one control).

Статистична обробка даних

Рівень експресії поверхневих маркерів вимірювали у відсотках та статистично обраховували з використанням U-критерію Мауна-Уїтні.

Результати та обговорення

Порівняльний гістологічний аналіз структури тканини хоріона, кріоконсервованої за різних умов

Гістологічний аналіз структури тканини хоріона до кріоконсервування проводили на 39 зразках, із яких для 9 зразків аналізували структуру тканини після кріоконсервування за різних умов. Для кріоконсервування хоріона було використано 0,7 М, 1,5 М ДМСО та 1,5 М 1,2-пропандіол. На рис. 1 (А, Б) наведено структуру нативної тканини хоріона.

У ворсинках хоріона фіксували епітеліальний шар клітин трофобласта та стромальну тканину, пронизану великою кількістю кровоносних судин. Скупчення еритроblastів на різних стадіях диференціювання було відзначено як у судинах, так і в стромі ворсинок. У деяких зонах мав місце контакт еритроblastів з цитотрофобластом.

Гістологічним аналізом тканини хоріона, кріоконсервованого з 0,7 М ДМСО, показано присутність великої кількості ушкоджених еритроblastів у судинах (рис. 1, В) та стромальній тканині хоріона (рис. 1, Г). Також спостерігали поодинокі зони лізису

стромі ворсинок (рис. 1, Д). Однак, за повільного відмивання кріопротектора в деяких ворсинках залишалися інтактні еритроblastи, що свідчить про руйнування цих клітин при розморожуванні (рис. 1, Е).

Збільшення концентрації ДМСО до 1,5 М сприяє збереженню еритроblastів у ворсинках хоріона 5–9 тижнів гестації та еритроцитів у зразках 10–12 тижнів гестації (рис. 1, Є). Аналіз тканини, яку кріоконсервували з 1,5 М 1,2-пропандіолу, також показав збереження еритроblastів та еритроцитів відповідно до строку гестації (рис. 1, Ж). Однак слід наголосити, що гістологічний аналіз зразків кріоконсервованого хоріона не дозволяє детектувати накопичені в процесі заморожування мікроушкодження, що унеможлиблює встановлення відмінностей у ефективності збереження структури тканини за експериментальних умов з використанням 1,5 М ДМСО та 1,5 М 1,2-пропандіолу.

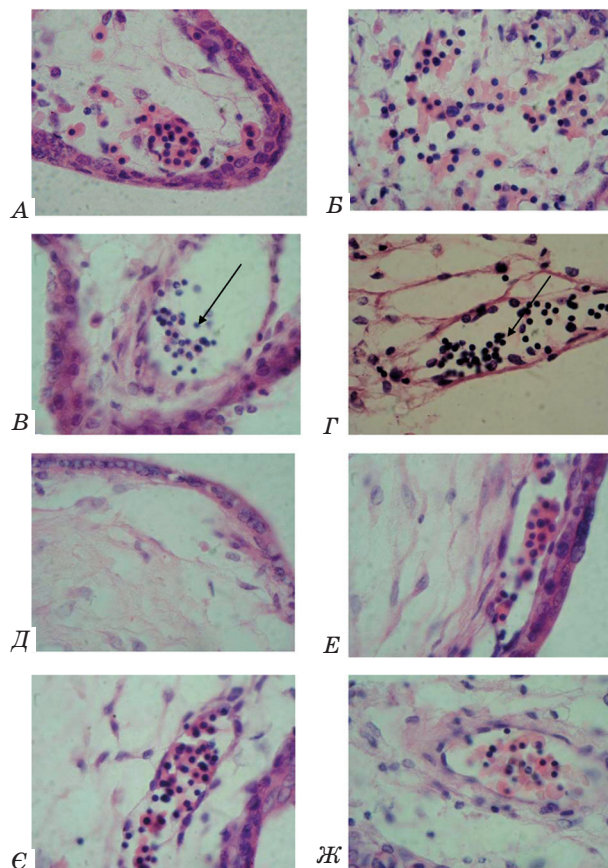


Рис. 1. Мікроструктура нативної (А, Б) і кріоконсервованої з 0,7 М ДМСО (В, Г, Д, Є) та з 1,5 М ДМСО (Є) і PrOH (Ж) тканини хоріона: А, Б, В, Г, Е, Ж — тканина хоріона плода 10-го тижня гестації; Д, Е — тканина хоріона плода 12-го тижня гестації.

Стрілками позначено ядра ушкоджених еритроblastів. Забарвлення гематоксилін-еозином. ×400

Виділення клітин з тканин нативного та кріоконсервованого хоріона

Нами було підібрано оптимальні умови ізолювання клітин з тканини хоріона, замороженої під захистом 1,5 М ДМСО. У разі оброблення тканини ензимами отримували суспензію клітин, життєздатність яких під час фарбування трипановим синім коливалась у межах 42–90% ($n=5$).

Після висіву клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти на 5-ту й 9–10-ту доби культивування, відповідно, виростили клони клітин, які за своєю морфологією були схожі на колонії трофобластних стовбурових клітин [4, 5]. У процесі подальшого культивування навколо клонів спостерігали міграцію і ріст фібробластоподібних та епітеліальних клітин (рис. 2, А, В). У разі пересіву культури клітин клональний ріст не відбувався.

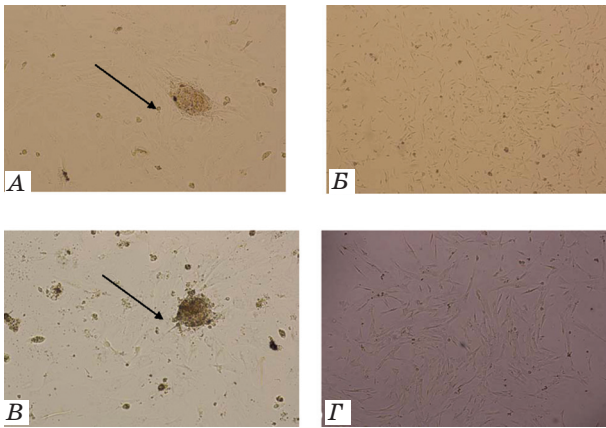


Рис. 2. Культури клітин, отримані з нативної (А, В) та з кріоконсервованої (В, Г) тканини хоріона з 1,5 М ДМСО:

А — 5-та доба росту; В — 9-та доба росту; В — 11-та доба росту; Г — 14-та доба росту. Стрілками позначено колонії клітин хоріона. Світлова мікроскопія. $\times 50$

Утворення моношару клітин, отриманих з нативної тканини, досягалося у середньому на 6-ту добу, для кріоконсервованої тканини — в середньому на 23-тю добу. Під час подальшого культивування швидкість формування конфлюенсу клітинами, що отримані з нативної та кріоконсервованої тканини хоріона, не відрізнялася. Затримка росту в первинній культурі клітин з кріоконсервованої тканини хоріона, можливо, пов'язана з більшою кількістю клітин, що з часом відкріплялися від пластику, зменшуючи щільність прикріплених клітин.

У культурі більшість клітин з нативної та кріоконсервованої тканини на перших па-

сажах були сильно розпластані, мали численні вирости, тимчасом як інші характеризувалися витягнутою веретеноподібною формою (рис. 2, В). У клітинах спостерігали наявність 1 ядра з 1–4 ядерцями.

На 5–8-му пасажах у культурі відбувалося зниження проліферативної активності клітин, збільшення їхніх розмірів, з'являлися багатоядерні клітини з великими відростками (рис. 3).

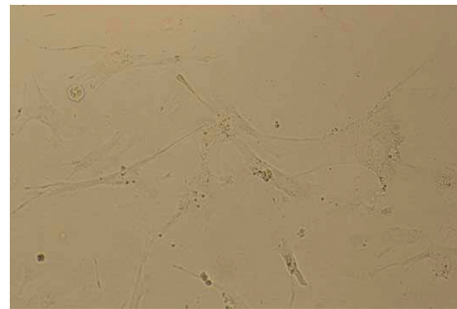


Рис. 3. Культура клітин, отриманих із кріоконсервованої тканини хоріона з 1,5 М ДМСО, 5-й пасаж. Світлова мікроскопія. $\times 100$

Імунофенотиповий та імуноцитохімічний аналіз клітин, виділених з нативної та кріоконсервованої тканини хоріона

Під час імунофенотипування популяції клітин, отриманих з нативного хоріона, з використанням протокової цитофлуорометрії було виявлено високий рівень експресії маркерів CD90, CD73, CD105 та відсутність експресії CD45, CD34, CD14 (рис. 4).

Культура фібробластоподібних клітин кріоконсервованого хоріона також мала імунофенотип $CD90^+CD73^+CD105^+CD45^-CD34^-CD14^-$ (рис. 5).

У деяких клітинах, одержаних із кріоконсервованого хоріона, спостерігали двомодальний розподіл клітин за маркером CD90 (рис. 6).

Культури клітин з двомодальним розподілом клітин за маркером CD90 зберігали такий характер експресії протягом чотирьох пасажів (рис. 8). Слід відзначити, що в культур з двомодальним розподілом відбувається достовірно зростання популяції клітин $CD90^-$ (рис. 7, 8) з 2-го по 4-й пасаж, хоча в деяких із них спостерігали стабільну експресію цього маркера на рівні 75%.

У деяких клітинних популяціях з одномодальним розподілом клітин за маркером CD90 також відбувається зниження експресії цього маркера під час пасажування (рис. 7, 8).

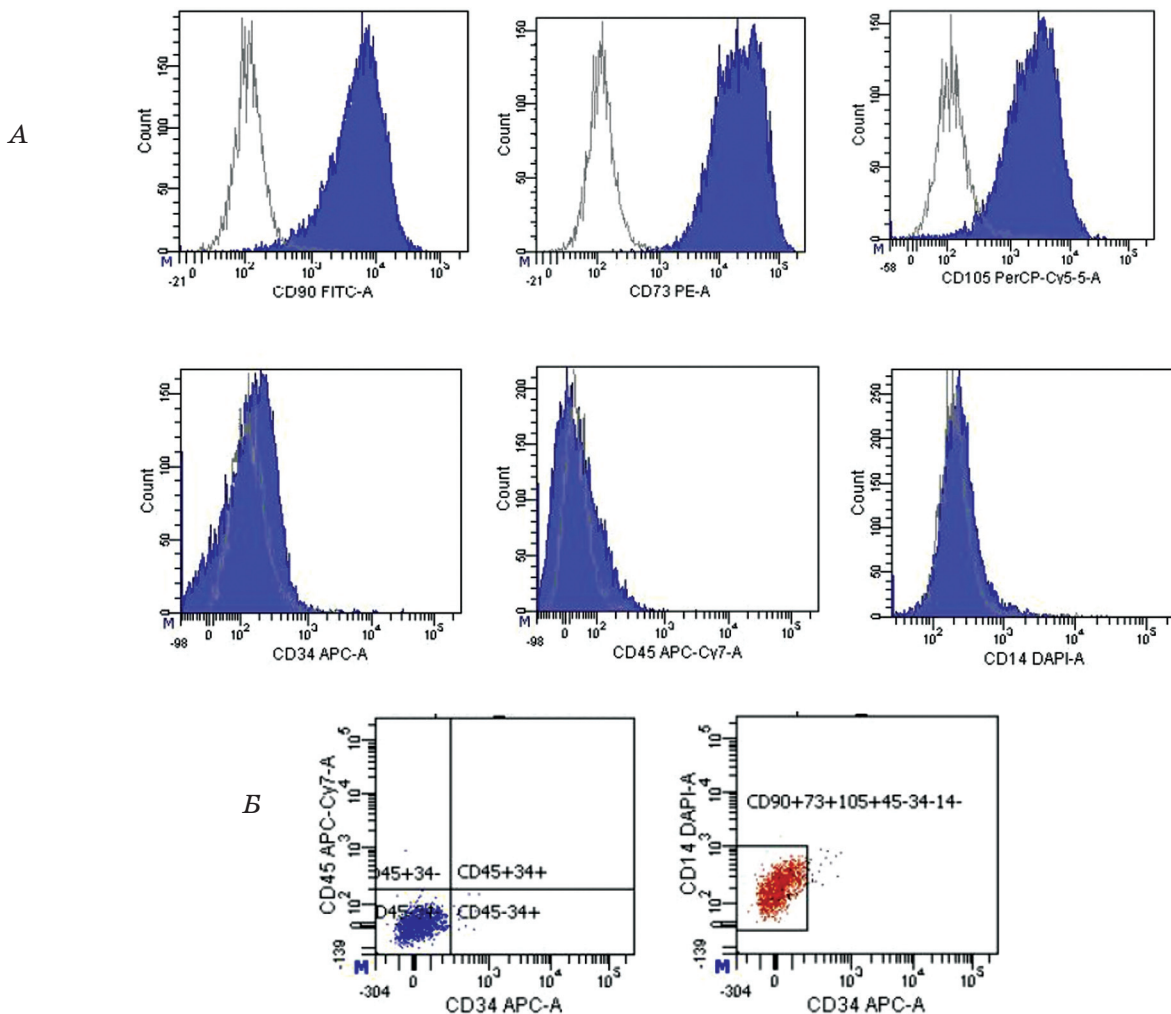


Рис. 4. Гістограми експресії поверхневих маркерів у культурі клітин, отриманій з нативної тканини хоріона (2-й пасаж):

А — рівні експресії CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD14 (сірий контур — фоновий рівень флуоресценції);
 Б — двовимірні гістограми популяцій клітин з фенотипом CD90⁺CD73⁺CD105⁺CD34⁻CD45⁻CD14⁻

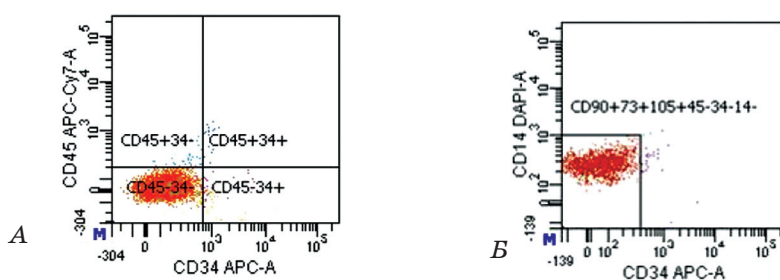


Рис. 5. Гістограми експресії поверхневих маркерів у популяціях клітин, виділених із тканини кріоконсервованого хоріона: показано популяції клітин CD34⁻CD45⁻ (А) та CD90⁺CD73⁺CD105⁺CD34⁻CD45⁻CD14⁻ (Б)

Цей факт було описано також багатьма дослідниками [6–8], які вивчали культуру клітин ММСК, отриману з нативної тканини плаценти людини.

Слід відзначити достовірно меншу експресію CD90 в культурі клітин кріоконсервованого хоріона з двомодальним розподілом порівняно з клітинами, одержани-

ми з нативного хоріона на 2- та 4-му пасажах. Подібну відмінність спостерігали і за порівняння з клітинами з одномодальним розподілом CD90 (отриманими з кріоконсервованої тканини) на 2-му пасажі, хоча з пасажуванням ця різниця зникла внаслідок зниження рівня експресії клітинами цього маркера (рис. 7).

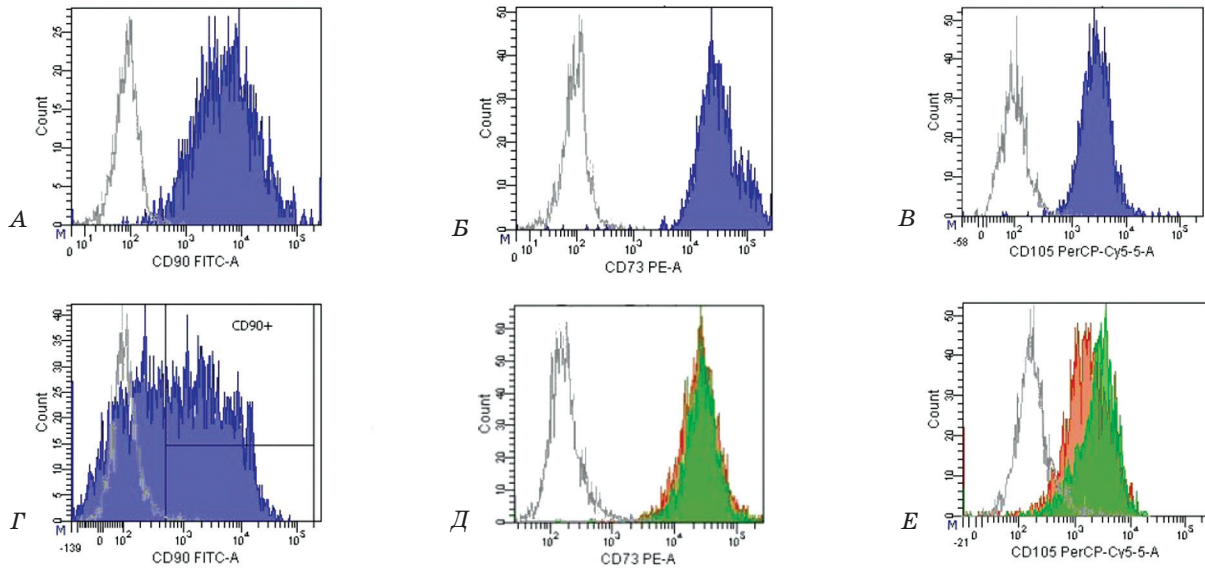


Рис. 6. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105 на клітинах, отриманих з кріоконсервованої тканини хоріона, 2-й пасаж: експресія маркерів CD73 (Б) та CD105 (В) за одномодального розподілу популяцій клітин за маркером CD90 (А); експресія маркерів CD73 (Д) та CD105 (Е) за двомодального розподілу популяцій клітин за маркером CD90 (Г).

Синій колір — усі клітини; зелений колір — популяція CD 90⁺; червоний — CD 90⁻; сірий контур — фоновий рівень флуоресценції

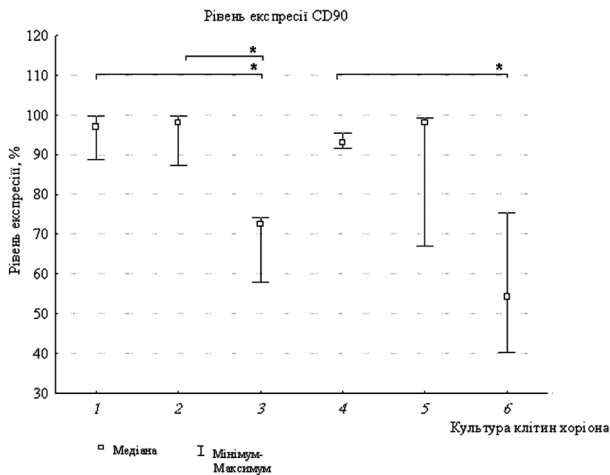


Рис. 7. Рівень експресії маркера CD90 в популяції клітин хоріона:

- 1 — популяція клітин нативного хоріона 2-го пасажу;
- 2 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 2-го пасажу з одномодальним характером розподілу рівня експресії;
- 3 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 2-го пасажу з двомодальним характером розподілу рівня експресії;
- 4 — популяція клітин нативного хоріона 4-го пасажу;
- 5 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 4-го пасажу з одномодальним характером розподілу рівня експресії;
- 6 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 4-го пасажу з двомодальним характером розподілу рівня експресії при $n = 3$, $P = 0,05$

Отже, можна стверджувати, що клітини з одномодальним розподілом за маркером CD90, одержані з нативної та кріоконсервованої тканини хоріона, не відрізнялися за характером експресії цього поверхневого маркера на різних пасажах.

Частота отримання культур клітин з двомодальним розподілом клітин за маркером CD90 з кріоконсервованої тканини становила 50% ($n = 6$). Однак відсутність серед культур клітин нативної тканини хоріона такого двомодального розподілу клітин за маркером CD90, можливо, пов'язана з порівняно невеликою кількістю ($n = 3$) проаналізованих культур клітин. Таким чином, вплив кріоконсервування тканини хоріона на особливості експресії CD90 потребує подальших досліджень.

Зважаючи на дискретний характер розподілу клітин за експресією маркера CD90 та зростання популяції CD90⁻ під час пасажування культури клітин, можна припустити наявність різних попередників CD90⁺ та CD90⁻ клітин.

Так, відомо, що з пуповинної крові було виділено клони ММСК, які відрізнялися за морфологією, імунофенотипом та здатністю до диференціювання. Клітини, що мали веретеноподібну морфологію, були позитивними за CD24, CD49, SH2, SH3, SH4 та CD90, тоді як клітини більш розпластані та округлі відрізнялися відсутністю маркера CD90 [9]. Також потрібно відзначити присутність

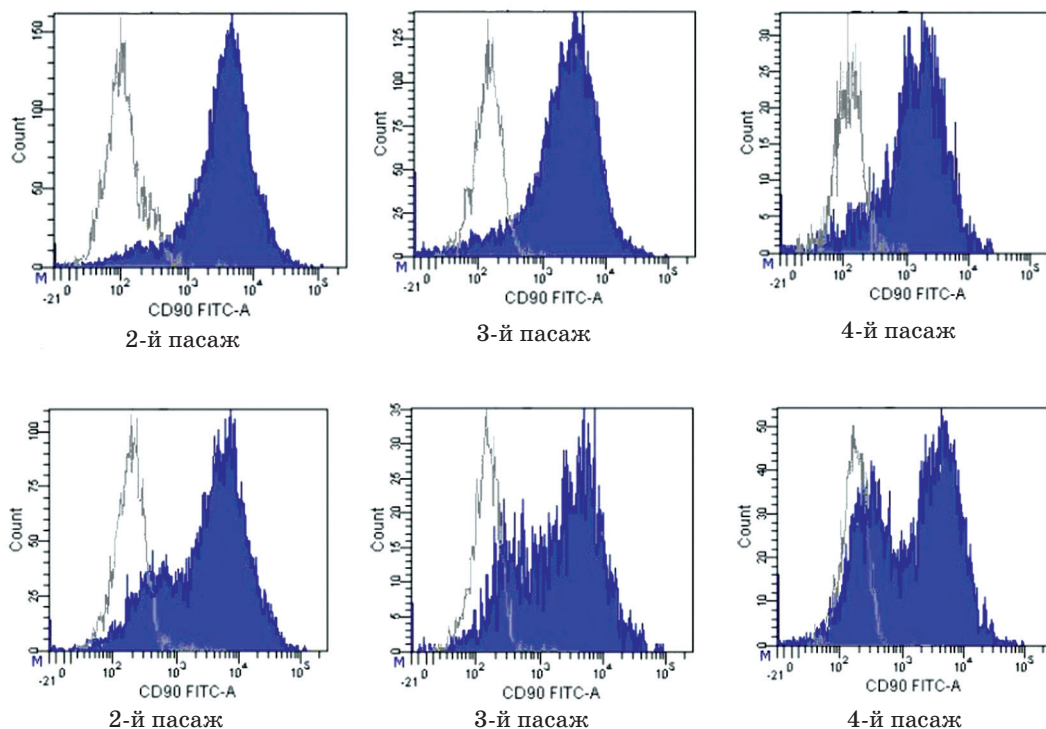


Рис. 8. Гістограми експресії поверхневого маркера CD90 в популяціях клітин, отриманих з кріоконсервованої тканини хоріона:

верхній ряд — популяція з одномодальним розподілом за CD90;
нижній ряд — популяція з двомодальним розподілом;
сірий контур — фоновий рівень флюоресценції

двох популяцій фібробластів, отриманих з легень мишей; клітини CD90⁺ мали веретеноподібну форму, а CD90⁻ — були плоскі та округлі [10]. У деяких роботах показано відсутність маркера CD90 на ММСК, одержаних з амніотичної оболонки [11].

Зниження експресії CD90 в культурах мезенхімальних клітин з амніона та хоріона людини корелювало зі зменшенням імуносупресивної дії на лімфоцити периферичної крові за їх співкультивування [6]. Також було встановлено, що після сепарування ММСК плаценти з експресією маркера CD349 (рецептор Wnt-лігандів) спостерігалось підвищення рівня CD90 [8].

У культурах клітин нативної та кріоконсервованої культури з одно- і двомодальним розподілом за маркером CD90 відсутня відмінність в експресії поверхневих маркерів CD73 та CD105 на 4-му пасажі (рис. 9).

Зростання кількості клітин з низьким рівнем експресії маркерів CD90 та CD105 із пасажуванням культури спостерігалось одночасно зі зниженням проліферативної активності, збільшенням розмірів, появою багатоядерності і кількості виростів клітин.

Імунофенотипування популяцій клітин нативного та кріоконсервованого хоріона на

1-му пасажі шляхом протокової цитофлуориметрії показало присутність мінорної популяції ендотеліальних прогеніторних клітин (рис. 10).

Імуноцитохімічним аналізом культур клітин нами було виявлено експресію цитокератинів (рис. 11). Слід зазначити, що панцитокератинпозитивні ММСК було отримано з пуповини [12], на відміну від ММСК пуповинної крові [13], однак у деяких роботах описано присутність цитокератинів 8 та 18 у культурі адгезивних клітин пуповинної крові, що поряд із відсутністю CD50, CD62L, CD106 дає підставу авторам відокремити їх від ММСК та віднести до особливого типу [14].

У роботі Koskull et al. (2005) було показано, що під час культивування мезенхімальні клітини фетального хоріона, шкіри та легень експресують цитокератини 8, 18 та 19, на відміну від фібробластів шкіри дітей та дорослих [15]. Поодинокі МСК кісткового мозку в культурі експресують цитокератини 18 та 19, які утворюють проміжні філаменти [16].

Високий рівень експресії цитокератинів клітинами, що були виділені з хоріона та зрілої плаценти, можливо, свідчить про особливість плацентарних стромальних клітин у культурі клітин *in vitro*.

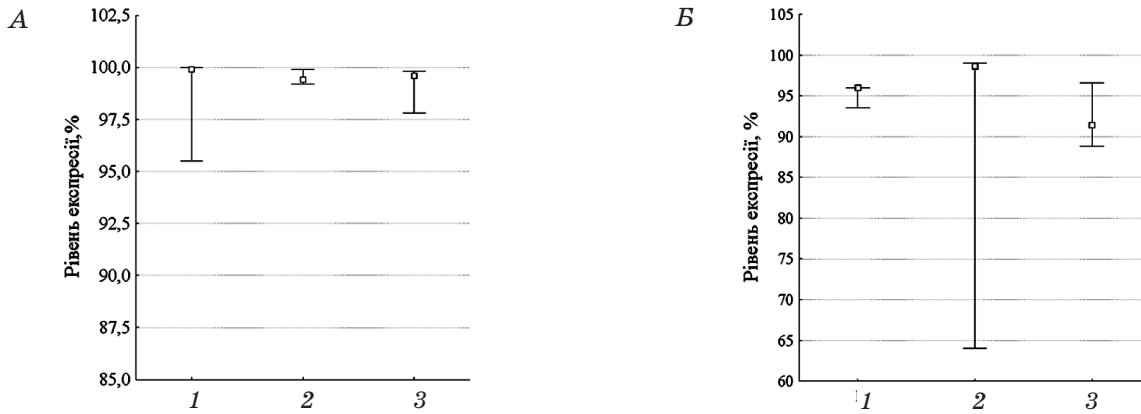


Рис. 9. Рівень експресії поверхневих маркерів у популяціях клітин хоріона: А — CD73, Б — CD105: 1 — популяція клітин нативного хоріона 4-го пасажу; 2 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 4-го пасажу з одномодальним характером розподілу рівня експресії; 3 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 4-го пасажу з двомодальним характером розподілу рівня експресії ($n = 3, P = 0,05$)

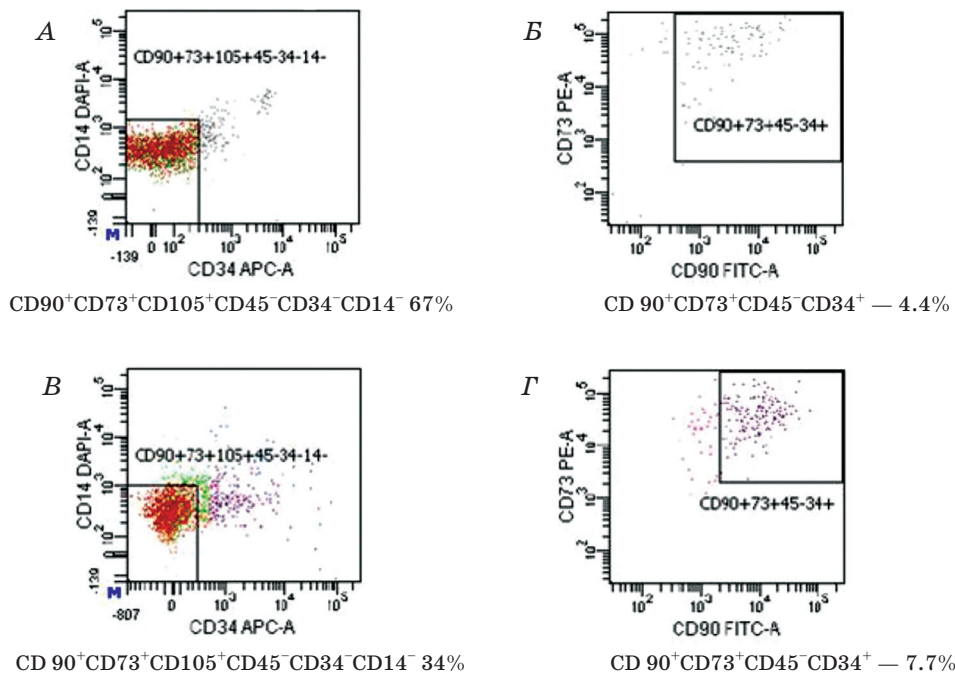


Рис. 10. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD14 у популяціях клітин (1-й пасаж), отриманих з нативної (А, Б) та кріоконсервованої (В, Г) тканин хоріона:

А, В — популяція клітин з фенотипом МСК;
 Б, Г — популяція клітин з фенотипом ендотеліальних прогеніторних клітин

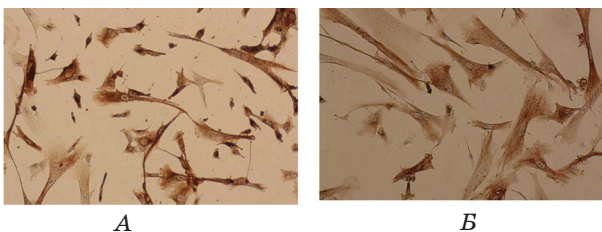


Рис. 11. Клітини, отримані з нативної (А) та кріоконсервованої (Б) тканини хоріона (4-й пасаж): імуноцитохімічне забарвлення на панцитокератин. $\times 400$

Присутність фібробластоподібних клітин з вищеписаним імунофенотипом у популяціях клітин кріоконсервованого хоріона відповідає мультипотентним мезенхімальним стромальним клітинам, оскільки вміст клітин з експресією CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺ перевищує 95% [17].

Отже, нами було підбрано умови кріоконсервування тканини хоріона, виділення та культивування мезенхімальних стромальних клітин хоріона (5–12 тижнів гестації). Виявлено деякі ушкодження тканини хоріона за різних режимів кріоконсервування

і показано особливості росту клітин кріоконсервованого хоріона *in vitro*. Уперше було описано імунофенотип популяції клітин стромы кріоконсервованого хоріона.

Таким чином, порівняльний гістологічний аналіз тканини хоріона до та після кріоконсервування з кріопротекторами показав, що під захистом 1,5 М розчину ДМСО і 1,5 М розчину 1,2-пропандіолу зберігаються еритроblastи (у тканині 5–9 тижнів гестації) та еритроцити (у тканині 10–12 тижнів гестації) у судинах та стромальній тканині. Це може свідчити про більшу ефективність застосування цих кріопротекторів у зазначених концентраціях, на відміну від застосування стандартного 0,7 М розчину ДМСО.

Кріоконсервування тканини з використанням 1,5 М ДМСО дає змогу отримати культуру клітин, що за своїм імунофенотипом відповідає ММСК. Культури клітин нативного та кріоконсервованого хоріона з одномодалним розподілом за експресією

CD90 не відрізняються. Встановлено достовірну різницю в рівні експресії маркера CD90 в популяціях клітин нативного та кріоконсервованого хоріона з двомодальним розподілом CD90 на 2- та 4-му пасажах, інших основних поверхневих маркерів ММСК на 2- та 4-му пасажах.

Також показано значно меншу кількість CD90⁺-клітин на 2-му пасажі в популяціях з двомодальним розподілом порівняно з популяціями, що мають одномодалний розподіл, хоча з пасажуванням цей ефект зникає внаслідок зниження рівня експресії клітинами цього маркера в популяціях клітин з одномодалним розподілом. Зниження рівня експресії маркерів CD90 та CD105 спостерігається одночасно з падінням проліферативної активності та набуттям клітинами багатоядерності. Виявлено експресію цитокератину в популяціях клітин, одержаних з нативного та кріоконсервованого хоріона. Походження таких популяцій клітин потребує більш детальних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Mihu C. M., Mihu D., Costin N., Ciuca D. R. et al.* Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord // *Rom. J. Morphol. Embryol.* — 2008. — V. 49, N 4. — P. 441–446.
2. *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.
3. *Robin C., Bollerot K., Mendes S. et al.* Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development // *Cell Stem Cell.* — 2009. — V. 5. — P. 385–395.
4. *Spitalieri P., Cortese G., Pietropolli A. et al.* Identification of Multipotent Cytotrophoblast Cells from Human First Trimester Chorionic Villi // *Cloning and stem cells.* — 2009. — V. 11, N 4. — P. 535 — 556.
5. *Lee et al.* Differentiation of human trophoblast stem cells in mammalian straitum // *Pat. N 7, 892, 534B2.* — 2011.
6. *Campioni D., Rizzo R., Stignani M. et al.* Decreased Positivity for CD90 on Human Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) Is Associated with a Loss of Immunosuppressive Activity by MSCs // *Clin. Cyt.* — 2009. — V. 76B. — P. 225–230.
7. *Hiwase S. D., Dyson P. G., TO L. B., Lewis I. D.* Cotransplantation of Placental Mesenchymal Stromal Cells Enhances Single and Double

8. *Cord Blood Engraftment in Nonobese Diabetic / Severe Combined Immune Deficient Mice // STEM CELLS.* — 2009. — V. 27. — P. 2293–2300.
9. *Tran T. C., Kimura K., Nagano M. et al.* Identification of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Involved in Re-Endothelialization // *J. Cell. Physiol.* — 2010. — V. 226. — P. 224–235.
10. *Chang Y.-J., Tseng C.-P., Hsu L.-F. et al.* Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood // *Cell Biol. Intern.* — 2006. — V. 30. — P. 495–499.
11. *Phipps R. P., Penney D. P., Keng P. et al.* Characterization of two major populations of lung fibroblasts: distinguishing morphology and discordant display of Thy 1 and class II MHC // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* — 1989. — V. 1. — P. 65–74.
12. *Hwang J. H., Shim S. S., Seok O. S. et al.* Comparison of Cytokine Expression in Mesenchymal Stem Cells from Human Placenta, Cord Blood, and Bone Marrow // *J. Korean. Med. Sci.* — 2009. — V. 24. — P. 547–554.
13. *Farias V. A., Linares-Fernandez J. L., Penalver J. L. et al.* Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties // *Placenta.* — 2011. — V. 32. — P. 86–95.
14. *Sueblinvong V., Loi R., Eisenhauer P. L. et al.* Derivation of Lung Epithelium from Human Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* — 2008. — V. 177. — P. 701–711.

14. Kogler G., Sensken S., Airey J. A. et al. A New Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential // *J. Exp. Med.* — 2004. — V. 200, N 2. — P. 123–135.
15. Koskull H. V., Virtanen I. Induction of cyto-keratin expression in human mesenchymal cells // *J. Cell. Physiol.* — 2005. — V. 133, N 2. — P. 321–329.
16. Wuchter P., Boda-Heggemann J., Straub B. K. et al. Processus and recessus adhaerentes: giant adherens cell junction systems connect and attract human mesenchymal stem cells // *Cell Tissue Res.* — 2007. — V. 328. — P. 499–514.
17. Dominic M., Blanc K. Le, Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* — 2006. — V. 8, N 4. — P. 315–317.

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ
ИЗ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ТКАНИ
ХОРИОНА**

*В. А. Шаблій^{1,2}
М. Д. Кучма²
В. М. Кирик³
Л. Л. Лукаш¹
Г. С. Лобинцева²*

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²ООО «Институт клеточной терапии»,

³ГУ «Институт генетической и регенеративной
медицины НАМН Украины»

В работе показана возможность получения культуры клеток из криоконсервированной ткани хориона с использованием 1,5 М ДМСО. Впервые описаны особенности формирования культуры клеток хориона человека и ее иммунофенотип. Установлен характер экспрессии маркера CD90 в культурах клеток, полученных из криоконсервированной ткани хориона. Снижение уровня экспрессии CD90 и CD105 наблюдается одновременно с приобретением клетками многоядерности. Показано присутствие популяции эндотелиальных прогениторных клеток в культуре клеток хориона человека на первом пассаже. Обнаружена экспрессия цитокератина в популяциях клеток, полученных из нативного и криоконсервированного хориона.

Ключевые слова: хорион, криоконсервирование, культура клеток, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.

**THE PHENOTIPIC CHARACTERIZATION
OF CELL CULTURE DERIVED
FROM CRYOPRESERVED
CHORIONIC TISSUE**

*V. A. Shablii^{1,2}
M. D. Kuchma²
V. M. Kyryk³
L. L. Lukash¹
G. S. Lobintseva²*

¹Institute of molecular biology and genetics
of National Academy of Science of Ukraine,

²LLC Institute of Cell Therapy,

³State institute of genetics and regenerative
medicine Academy of Medicine of Ukraine

It was shown possibility of cell culture obtaining from cryopreserved chorion tissue using 1.5 M DMSO. For the first time we described features of the cell culture formation from cryopreserved human chorion and its immunophenotype. We described the character of CD90 marker expression in cultures of the cells derived from cryopreserved chorion tissue. Decreasing of expression of the markers CD90 and CD105 was observed together with drop in proliferative activity and acquisition of multinuclearity for the cells. The population of endothelial progenitor cells in cell culture was detected on the first passage. Expression of cytokeratins was found in populations of the cells derived from native and cryopreserved chorion tissue.

Key words: chorion, cryopreservation, cell culture, multipotent mesenchymal stromal cells.