

УДК 57.085.23

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ХОРИОНА ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КЛЕТОК В КУЛЬТУРУ

© 2019 г. М. А. Шилина¹, *, Д. Н. Силачев², К. В. Горюнов², И. В. Кожухарова¹, Н. А. Пуговкина¹, О. Г. Люблинская¹, Ю. С. Иванова¹, Н. Н. Никольский¹, Т. М. Гринчук¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Национальный Медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, Москва, 117198 Россия

*E-mail: shili-mariya@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.08.2019 г.

После доработки 16.09.2019 г.

Принята к публикации 20.09.2019 г.

Хорион – это наружная оболочка зародыша, развивающаяся из трофобласта и подстилающей его мезенхимы. Задачей настоящей работы было охарактеризовать клеточные линии, полученные из хориона разных доноров. Фенотипический анализ 3-х линий, полученных от трех разных доноров, показал, что клетки имеют профиль экспрессии поверхностных CD-маркеров, типичный для мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека. В процессе культивирования клетки характеризовались фибробластоподобной морфологией. На пассажах 4–5 динамика клеточного цикла была характерной для нормальных клеток человека мезенхимного ряда: в логарифмической фазе роста регистрировали увеличение доли клеток в фазах синтеза ДНК и митоза, которая снижалась впоследствии при уплотнении культуры. На пассажах 6–7 характер распределения клеток по фазам клеточного цикла менялся: доля клеток в фазе синтеза ДНК уменьшалась. Клетки накапливались в фазе G₂/М и увеличивалась доля полиплоидов, с количеством генетического материала >2n. Методом проточной цитометрии было показано быстрое снижение пролиферативной активности клеток проанализированных линий по мере их пассирования. Время удвоения клеточной популяции на пассажах 4–5 для одной линии составляло 40 ч, а к пассажи 6–7 увеличилось до 52 ч. Для двух других линий время удвоения на пассажах 4–5 составляло около 80 ч. После 6–7-ого пассажа клетки погибали. Методом ELISA был выявлен значительный уровень секреции VEGF. Кариологический анализ показал, что клетки хориона в культуре имеют околодиплоидный кариотип, склонный к полумкам хромосомного материала. По результатам настоящей работы можно заключить, что МСК хориона не являются самым оптимальным объектом для использования в лабораторных исследованиях с длительными экспериментами. Высокий уровень секреции VEGF позволяет рассматривать их как источник кондиционной среды для лечебных целей.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки человека, хорион

DOI: 10.1134/S0041377119120046

Регенеративная медицина, основанная на использовании клеток взрослого организма, развивается с каждым годом. Для ее целей чаще всего используют мезенхимные стромальные клетки (МСК) человека. В 2006 г. Международным сообществом клеточной терапии были утверждены критерии по определению мультипотентных МСК человека. Такие клетки должны обладать: 1) адгезивностью к пластику при стандартных условиях культивирования; 2) позитивной экспрессией маркеров CD105, CD73, CD90 и отсутствием экспрессии гемопоэтических маркеров CD19, CD34, CD45 и HLA-DR (класса II); 3) способностью дифференцироваться

под воздействием определенных стимулов в другие клетки мезодермы *in vitro* (Dominici et al., 2006). Долгое время главным источником МСК для научных и клинических исследований оставался костный мозг. В настоящее время, кроме костного мозга, распространенными источниками для выделения МСК являются жировая ткань (Parker, Katz, 2006), пуповинная кровь (Harris et al., 2007), амниотическая жидкость (De Coppi et al., 2007) и ткань эндометрия (Cho et al., 2004; Gargett, 2006). Продолжаются работы по постоянному поиску новых источников МСК и сравнительный анализ таких клеток для отбора наиболее удобного источника МСК в целях регенеративной медицины. Важным при этом является рассмотрение не только их физиологических и генетических параметров, но и их секреторной способности. В

Принятые сокращения: МСК – мезенхимные стромальные клетки, СК – стволовые клетки, VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

связи с последними данными о паракрином влиянии трансплантируемых СК в целях регенеративной медицины (Baraniak, McDevitt, 2010; Park et al., 2018), появились работы по использованию кондиционной среды без использования клеточного продукта непосредственно (Srigamulu et al., 2018). В постоянном поиске новых источников МСК в целях регенеративной медицины мы обратили свое внимание на клетки хориона человека. Хорион — это наружная оболочка зародыша, развивающаяся из трофобласта и подстилающей его мезенхимы. Работы по получению и характеристике МСК из хориона довольно редки и получили активное развитие сравнительно недавно (Abumaree et al., 2013; Roselli et al., 2013; Ventura Ferreira et al., 2018).

В связи с этим задачей настоящей работы было охарактеризовать клеточные линии, полученные из хориона разных доноров. Кроме того, оценивали секрецию клетками фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Биологический материал и культивирование. В работе были использованы три первичные линии клеток хориона, с рабочим названием 27_1, 27_2, 27_3, полученные сотрудниками Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ (Москва). Предоставленные для анализа клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (FBS; HyClone, США), 1% смеси антибиотика и антимикотика (Gibco, США), 1% глутамакса (Gibco, США). Пересев клеток проводили с использованием 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA (Invitrogen, США) в соотношении 1 : 2 1–2 раза в 1 нед. Для культивирования использовали флаконы T25 и T75 (Fisher Scientific, США).

Криоконсервация. Клетки, открепленные от подложки с помощью 1 мл смеси 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA, помещали в пробирку с 3 мл культуральной среды и центрифугировали со скоростью 1500 g в течение 5 мин. Затем клетки (из расчета 1 млн/мл) ресуспензировали в растворе 90%-ной FBS, содержащей 10% DMSO (Sigma, США), переносили в криовials (Nunc, США), замораживали со скоростью 1°C/мин и далее хранили в жидком азоте. Для разморозки ампулу с клетками быстро нагревали в водяной бане при 37°C, суспензию переносили в пробирку с 7 мл теплой ростовой среды, чтобы отмыть DMSO, и осаждали центрифугированием при 1500 g в течение 5 мин. Подготовленные таким образом клетки можно было использовать в работе.

Анализ морфологии и иммунофенотипа МСК. Для оценки морфологии клеток использовали световой микроскоп CarlZeiss (Германия) при увеличе-

нии объектива 4× и 20×. Для оценки поверхностных CD-маркеров использовали проточный цитофлуориметр Epics XL (Beckman Coulter, США). Клетки переводили в суспензию с помощью смеси 0.05%-ного трипсина и EDTA. Клетки центрифугировали и ресуспензировали (1 млн/мл) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), содержащем 5% FBS. Для анализа использовали антитела, конъюгированные с FITC, к CD34, CD44, CD45, CD90, а также антитела к CD73, CD105, CD146, HLA-DR, меченные флуорофором фикоэритрином (PE).

Оценка активности пролиферации и распределения клеток по фазам клеточного цикла. По кривым клеточного роста оценивали среднее время удвоения популяции, используя формулу: $Td = tlg2/lg(Nt/N0)$, где Td — среднее время удвоения популяции, t — время прироста популяции, Nt — число клеток через время t, N0 — исходное число клеток.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла. Клетки, переведенные в суспензию, пермеабелизовали раствором сапонина (250 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли РНКазу А (250 мкг/мл), йодистый пропилий (50 мкг/мл) в культуральную среду и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Анализировали распределение клеток по фазам клеточного цикла с использованием цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter, США). Долю клеток в разных фазах цикла определяли с помощью программного обеспечения WinList и ModFit LT.

Анализ секреции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Использовали набор реактивов для ELISA DuoSet Human VEGF (R&D systems, США) согласно инструкции производителя.

Кариотипический анализ. Препараты метафазных хромосом получали по схеме: накопление клеток в стадии метафазы с использованием митостатика, обработка их гипотоническим раствором, фиксация и раскапывание суспензии на предметные стекла. В качестве митостатика использовали 0.05 мкг демиколцина (Sigma, США) на 1 мл среды. МСК открепляли от пластика 0.05%-ным раствором трипсина и EDTA. Гипотоническую обработку проводили 0.56%-ным раствором KCl. Клетки фиксировали стандартным способом в трех сменах свежеприготовленной смеси метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Смену фиксатора проводили по средствам центрифугирования клеточной суспензии с последующим удалением супернатанта. Фиксированный материал раскапывали на влажные охлажденные предметные стекла и высушивали при комнатной температуре. Хромосомы окрашивали на G-диск красителем Гимза в фосфатном буфере (pH 6.4) после предварительной обработки 0.05%-ным раствором трипсина по модифицированному методу Сибрайта (Seabright, 1977). Метафазные пластинки анализировали с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия) с использовани-

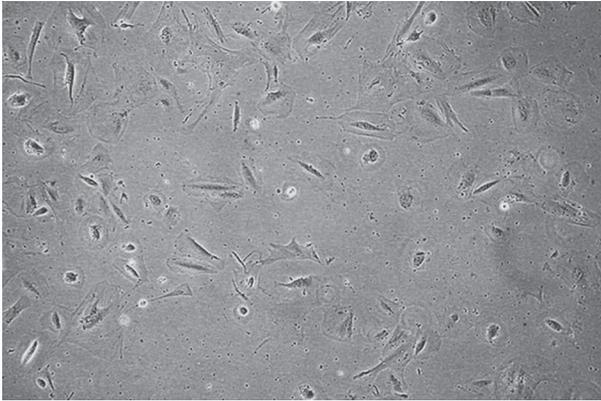


Рис. 1. Морфология МСК хориона в культуре. Пассаж 4. Об.: 20×.

ем иммерсионного объектива с увеличением 100×. Хромосомы идентифицировали в соответствии с международной номенклатурой (Mitelman, 1995) и атласом хромосом человека (Мамаева, 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изученных клеток хориона в культуре была характерна фибробластоподобная морфология (рис. 1). На пассажах 1–4 клетки пересевали дважды в неделю в соотношении 1 : 2. На пассажах 5–7 наблюдали замедление их роста, пересев проводили 1 раз в неделю в соотношении 1 : 2. После 7-ого пассажа клетки погибали.

В условиях *in vitro* клетки характеризовались поверхностными CD-маркерами, типичными для МСК экспрессии поверхностных CD-маркеров, типичным для МСК (табл. 1). В процессе культивирования профиль экспрессии не менялся.

Оценка пролиферативной активности анализируемых клеток с помощью проточной цитометрии показала, что скорость прохождения фаз клеточного цикла у разных линий была разной. Наиболее активно пролиферирующей клеточной культурой была линия 27_2. Медленно пролиферирующей клеточной культурой была линия 27_1. Пролиферативная способность всех 3-х линий быстро снижалась по мере пассирования клеток. Построение кривых роста клеток для каждой линии позволило определить время удвое-

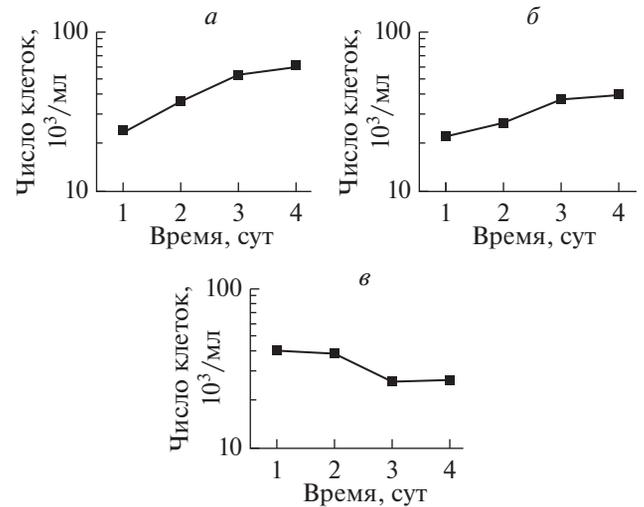


Рис. 2. Кривые роста клеток МСК хориона. Линии: а – 27_2 (пассаж 5), б – 27_1 (пассаж 6), в – 27_3 (пассаж 7).

ния популяций в логарифмической фазе роста на разных пассажах.

На пассажах 4–5 время удвоения числа клеток линии 27_2 составляло 40 ч (рис. 2а), а на пассажах 6–7 оно составляло уже 52 ч. Для клеток линий 27_1 и 27_3 на пассажах 4–5 это время составляло около 80 ч (рис. 2б), а после 7-ого пассажа уже наблюдали клеточную гибель (рис. 2в).

Анализ динамики клеточного цикла клеток показал следующее. На ранних пассажах (4–5) характер распределения клеток по фазам клеточного цикла не отличался от нормальных клеток человека мезенхимного ряда: в логарифмической фазе роста регистрировали значительную долю клеток в фазах синтеза ДНК и митоза, которая снижалась впоследствии при уплотнении культуры (рис. 3а). На пассажах 6–7 характер распределения клеток по фазам клеточного цикла изменялся: наблюдали уменьшение доли клеток в фазе синтеза ДНК, накопление клеток в фазе G₂/M (рис. 3б) и значительное увеличение доли полиплоидных клеток с количеством генетического материала >2n (рис. 3в). Для клеток линий 27_2 и 27_1 эти изменения были более выражены, чем для линии 27_2.

Таблица 1. Уровень экспрессии поверхностных CD-маркеров линиями МСК, полученными от 3-х доноров. Данные проточной флуориметрии

| Линия МСК (пассаж) | Уровень экспрессии, % | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 45 | CD34 | CD44 | CD73 | CD90 | CD105 | CD146 | HLA1 | HLA2 |
| 27_1 (4) | 1.34 | 0.27 | 99.9 | 99.94 | 69.04 | 99.61 | 92.09 | 99.32 | 19.25 |
| 27_2 (4) | 0.48 | 0.07 | 99.35 | 99.52 | 83.96 | 99.36 | 95.05 | 99.67 | 20.75 |
| 27_3 (5) | 10.57 | 0.25 | 100 | 100 | 97.48 | 99.83 | 98.84 | 99.92 | 53.14 |

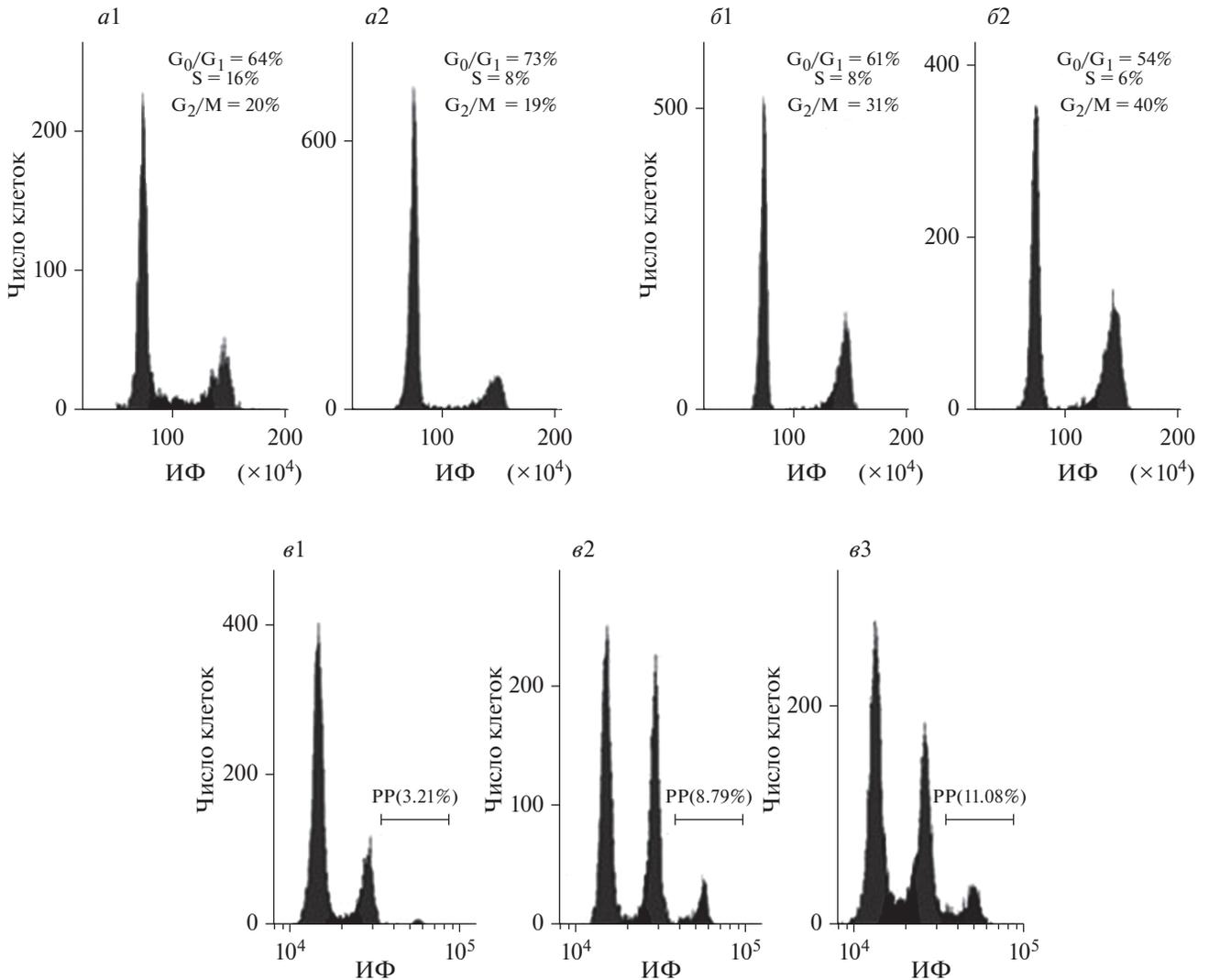


Рис. 3. Распределение МСК хориона трех линий по фазам клеточного цикла. Линии: 27_2 пассаж 5 через 24 (a1) и 96 (a2) ч после посева клеток; 27_3 пассаж 6 через 24 (б1) и 96 (б2) ч после посева клеток; 27_2 пассаж 5 (в1), 27_3 пассаж 6 (в2) и 27_1 пассаж 6 (в3) через 96 ч после посева. На гистограмме указаны фазы клеточного цикла. ИФ-интенсивность флуоресценции. Окраска DAPI (a, б) и Hoechst (в).

В процессе культивирования клеток был проведен анализ синтеза ими VEGF. Количество VEGF в кондиционной среде линий 27_3 (пассаж 3) и 27_1 (пассаж 4) составляло 125 и 440 пг/мл соответственно.

Кариологический анализ полученных линий показал, что клетки хориона в культуре имеют околодиплоидный кариотип, склонный к поломкам хромосомного материала (рис. 4). Вариабельность структуры кариотипического набора носит случайный характер.

Таким образом, можно заключить, что проанализированные нами клеточные линии хориона по своим физиологическим характеристикам (морфологии, фенотипическому профилю) относятся к ряду

мезенхимных клеток и способны пролиферировать в условиях *in vitro* вплоть до 7-ого пассажа, после чего клетки погибают. На ранних пассажах клетки хориона характеризуются высоким уровнем секреции VEGF, что может представлять ценность для регенеративной медицины.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что СК, используемые в целях регенеративной медицины, должны отвечать ряду требований — обладать генетической безопасностью и возможностью нарастить их в большом количестве *in vitro* (Sykova, Forostyak, 2013; Borgonovo et al., 2014; Mahla, 2016). Подводя итог настоящей работы можно выделить ряд особенностей МСК хориона в культуре:

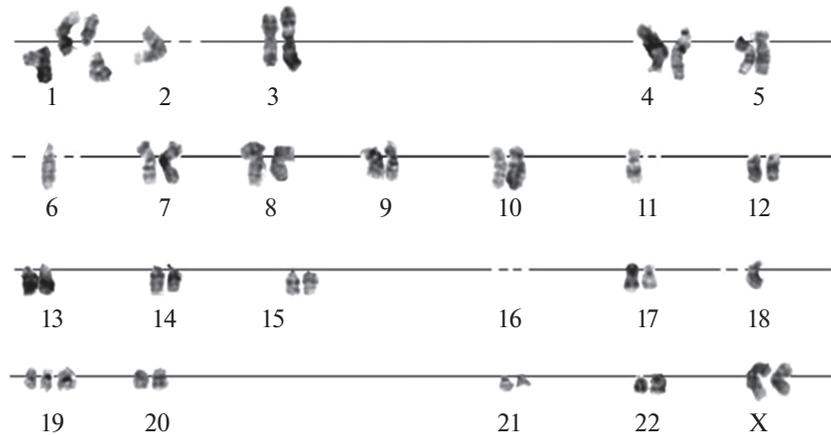


Рис. 4. Кариограмма МСК хориона. Дефекты метафазной пластинки. Число хромосом 41. Показаны прицентромерные поломки двух гомологов хромосомы 1, моносомия по хромосомам 2, 6, 11, 18, отсутствие 2-х гомологов хромосомы 16 и трисомия по хромосоме 19.

К числу основных недостатков данного объекта должен быть отнесен короткий жизненный цикл клеток хориона в культуре, связанный с быстрым угасанием их активной пролиферации. Так, если эндометриальные мезенхимные клетки (эмСК) до момента гибели *in vitro* могут активно пролиферировать на протяжении 25–30 пассажей (Земелько и др., 2011; Домнина и др., 2013; Shilina et al., 2018), клетки хориона активно пролиферируют только в течение 3–4-х пассажей, а после 7-ого пассажа погибают.

Вторым большим недостатком МСК хориона является то, что их короткий жизненный цикл не позволяет им пройти полный период адаптации к условиям *in vitro*. Стресс, связанный с переводом клеток из системы *in vivo* в систему *in vitro*, как и любой другой вид стресса, сопряжен с теми или иными изменениями в структуре кариотипа. По нашим данным в популяции СК при их переводе в условия *in vitro* возможно появление анеуплоидных клеточных вариантов и возникновение хромосомных перестроек (Шилина и др., 2016). Известно, что возникновение анеуплоидных вариантов связано с нарушением механизма клеточного деления (Pellman, 2007; Compton, 2011). Возникновение структурных перестроек (делений, инсерций, транслокаций) сопряжено с поломками хромосомного материала вследствие нерепарируемых разрывов ДНК (Togovnick, Schumacher, 2015; Barnes et al., 2018). При длительном культивировании дефектные клетки могут нивелироваться отбором, что мы наблюдали в процессе продолжительного культивирования эндометриальных МСК (Шилина и др., 2016). Выявление кариотипической нестабильности клеток хориона в культуре объясняется их коротким жизненным циклом. В течение 7 пассажей, 4 из которых культура угасает, дефектные варианты не успевают нивелироваться.

Третьим, не менее важным недостатком изученных нами МСК является то, что быстро угасающая

пролиферативная активность МСК хориона в культуре затрудняет приготовление препаратов метафазных хромосом для кариологического анализа, необходимого при использовании МСК в медицинских целях. Данный факт находит подтверждение в литературе (Кулиев, 1976; Кухаренко, 1995).

По результатам настоящей работы можно заключить, что МСК хориона не являются оптимальным клеточным продуктом для использования в лабораторных исследованиях с длительными экспериментами. Высокий уровень секреции VEGF позволяет рассматривать их как источник кондиционной среды для лечебных целей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00108).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Домнина А.П., Фридлянская И.И., Земелько В.И., Пуговкина Н.А., Ковалева З.В., Зенин В.В., Гринчук Т.М., Никольский Н.Н. 2013. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. Цитология. 55(1) : 69–74. (Domnina A.P., Friedlyanskaya I.I., Zemelko V.I., Pugovkina N.A., Kovaleva Z.V., Zenin V.V., Grinchuk T.M., Nikolskiy N.N. 2013. Human endometrial mesenchymal stem cells are not spontaneously trans-

- formed during long-term cultivation. *Thyologia*. 55(1) : 69–74.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н.* 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. *Цитология*. 53(12) : 919–929. (*Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artsybasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Beachevaya N.K., Korsak V.S., Nikolskiy N.N.* 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium. Identification, characterization and use as a feeder layer for the cultivation of human embryonic stem lines. *Tsitologiya*. 53(12) : 919–929.)
- Кулиев А.М.* 1976. Фенотипические аспекты хромосомных эмбриолеталей человека. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М. 48 с. (*Kuliev A.M.* 1976. Phenotypic aspects of human chromosomal embryos: autoreferencing. *Doct. Thesis*. М. 48 p.)
- Кухаренко В.И.* 1995. Клеточные и биохимические аспекты эмбриопатий человека с аномальным набором хромосом. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М. 47 с. (*Kukhareenko V.I.* 1995. Cellular and biochemical aspects of human embryopathies with an abnormal set of chromosomes: autoreferencing. *Doct. Thesis*. М. 47 p.)
- Мамаева С.Е.* 2002. Атлас хромосом — постоянные клеточные линии человека и животных. М.: Науч. Мир. 231 с. (*Mamaeva S.E.* 2002. Atlas chromosomes permanent cell lines of human and animals. М.: Sci. World. 231 p.)
- Шилина М.А., Гринчук Т.М., Никольский Н.Н.* 2016. Оценка генетической стабильности эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека методами морфологического и молекулярного кариотипирования. *Цитология*. 58(11) : 825–831. (*Shilina M.A., Grinchuk T.M., Nikolskiy N.N.* 2016. Assessment of genetic stability of human endometrial mesenchymal stem cells by morphological and molecular karyotyping methods. *Tsitologiya*. 58(11) : 825–831.)
- Abumaree M.H., Jumah M.A., Kalionis B., Jawdat D., Khaldi A., Talabani A.A., Knawy B.A.* 2013. Phenotypic and functional characterization of mesenchymal stem cells from chorionic villi of human term placenta. *Stem Cell Rev. Rep.* 9(1) : 16–31. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9385-4>
- Baraniak P.R., McDevitt T.C.* 2010. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen. Med.* 2010. Jan; 5(1) : 121–143. <https://doi.org/10.2217/rme.09.74>
- Barnes J. L., Zubair M., Kaarthik J., Poirier M. C., Martin F.L.* 2018. Carcinogens and DNA damage. *Biochem. Soc. Trans.* 46 : 1213–1224.
- Borgonovo T., Vaz I.M., Senegaglia A.C., Rebelatto C.L., Brofman P.R.* 2014. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a cell technology center. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 36 : 202–207.
- Cho N.H., Park Y.K., Kim Y.T., Yang H., Kim S.K.* 2004. Life-time expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil. Steril.* 81 : 403–407.
- Compton D. A.* 2011. Mechanisms of aneuploidy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 : 109–113.
- De Coppi P., Bartsch G. Jr., Siddiqui M.M., Xu T., Santos C.C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A.C., Snyder E.Y., Yoo J.J., Furth M.E., Soker S., Atala A.* 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotechnol.* 25 : 100–106.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8 : 315–317.
- Gargett C.E.* 2006. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol.* 46 : 250–253.
- Harris D.T., Badowski M., Ahmad N., Gaballa M.A.* 2007. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 7 : 1311–1322.
- Mahla R.S.* 2016. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int. J. Cell Biol.* 6940283. <https://doi.org/10.1155/2016/6940283>
- Mitelman F. (Ed.)* 1995. ISCN: Intrnation system for human cytogenetic nomenclature. Basel : S. Karger. 114 p.
- Park W.S., Ahn S.Y., Sung S.I., Ahn J.Y., Chang Y.S.* 2018. Strategies to enhance paracrine potency of transplanted mesenchymal stem cells in intractable neonatal disorders. *Pediatr Res.* Jan; 83(1–2) : 214–222. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.249>
- Parker A.M., Katz A.J.* 2006. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert. Opin. Bio. Ther.* 6 : 567–578.
- Pellman D.* 2007. Cell biology: Aneuploidy and cancer. *Nature* 446 : 38–39.
- Roselli E.A., Lazzati S., Iseppon F., Manganini M., Marcato L., Gariboldi M.B., Maggi F., Grati F.R., Simoni G.* 2013. Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: Cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures. *Cytotherapy*. 15(11) : 1340–1351. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.06.019>
- Seabright M.* 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 11: 971–972.
- Shilina M.A., Grinchuk T.M., Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Alekseenko L.L., Elmuratov A.U., Nikolskiy N.N.* 2018. Cytogenetic and transcriptomic analysis of human endometrial MSC retaining proliferative activity after sublethal heat shock. *Cells*. 7 : 184. <https://doi.org/10.3390/cells7110184>
- Sriramulu S., Banerjee A., Di Liddo R., Jothimani G., Gopinath M., Murugesan R., Marotta F., Pathak S.* 2018. Concise review on clinical applications of conditioned medium derived from human umbilical cord-mesenchymal stem cells (UC-MSCs). *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* 12 : 230–234.

Sykova E., Forostyak S. 2013. Stem cells in regenerative medicine. *Laser Ther.* 22 : 87–92.

Torgovnick A., Schumacher B. 2015. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front. Genet.* 6 : 157.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00157>

Ventura Ferreira M.S., Bienert M., Müller K., Rath B., Goecke T., Opländer C., Braunschweig T., Mela P., Brümmendorf T.H., Beier F., Neuss J.S. 2018. Comprehensive characterization of chorionic villi-derived mesenchymal stromal cells from human placenta. *Stem Cell Res. Ther.* 9 : 28.
<https://doi.org/10.1186/s13287-017-0757-1>

CHARACTERISTICS OF CULTURED MESENCHYMAL STROMAL CELLS ESTABLISHED FROM HUMAN CHORION

M. A. Shilina^{a, *}, D. N. Silachev^b, K. V. Goryunov^b, I. V. Kozhukharova^a, N. A. Pugovkina^a,
O. G. Lyublinskaya^a, Yu. S. Ivanova^a, N. N. Nikolsky^a, and T. M. Grinchuk^a

^a*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

^b*Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, 117198 Russia*

**e-mail: shili-mariya@yandex.ru*

Chorion is the outer fetal membrane around embryo developed from the trophoblast and the underlying mesenchyme. The objective of this work was to characterize cell lines obtained from chorion of different donors. The expression profile of surface CD markers expression in 3 lines obtained from three different donors was typical for human mesenchymal stromal cells (MSC). During the long-term cultivation the cells maintained the fibroblast-like morphology. In passages 4–5 the dynamics of the cell cycle was common for normal human cells of the mesenchymal origin: increased cell number phases of DNA synthesis and mitosis in the logarithmic growth phase which subsequently decreased with cell density. In passages 6–7 the pattern of cell cycle distribution altered: cell number in the DNA synthesis phase decreased. Cells accumulated in the G₂/M phase and polyploids number increased. Flow cytometry showed a rapid decrease in the proliferative activity of the cells during their passaging. The population doubling time for the cell for one line in passages 4–5 was 40 h and it increased by passage 6–7 to 52 h. For the other two lines, the doubling time 80 h in passages 4–5 and the cells died after the 6–7th passage, ELISA revealed a significant level of VEGF secretion. Karyological analysis showed that chorionic cells in culture have a near-diploid karyotype, prone to breakdown of chromosome material. These results show that the chorionic MSC are not reliable an object both for use in laboratory studies with lengthy experiments and transplantation for regenerative medicine. However, a high level of VEGF factor secretion allows to consider these cells as a source of conditioned medium for therapeutic purposes.

Keywords: human mesenchymal stromal cells, chorion