

Порівняльна оцінка морфофункціональних характеристик кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел

Д.Б. Введенський^{1,2}, Н.О. Волкова¹, А.М. Гольцев¹

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, м. Харків

Comparative Evaluation of Morpho-Functional Characteristics of Cryopreserved Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Derived from Different Sources

D.B. Vvedenskyi^{1,2}, N.O. Volkova¹, A.M. Goltsev¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

²V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Виділення, культивування та кріоконсервування клітин мезенхімального походження є основою для отримання клітинного матеріалу, який використовується в регенеративній медицині для терапії патологій різного генезу. В роботі були проаналізовані морфофункціональні характеристики кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (кММСК) з хрящової та жирової тканин щурів.

Культури ММСК, отримані з жирової і хрящової тканини щурів, кріоконсервували під захистом 10% ДМСО і 20% фетальної бічачої сироватки зі швидкістю охолодження 1 град/хв до -80°C та наступним зануренням у рідкий азот. Кріоампули відігрівали на водяній бані при температурі 40°C до появи рідкої фази. Для фенотипічного аналізу кММСК після заморожування-відігріву забарвлювали моноклональними антитілами CD45-FITC, CD44-FITC, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE («BD Biosciences», США) згідно з інструкцією фірми-виробника. Для спрямованого диференціювання досліджуваних культур в адіпо- та хондрогеному напрямках змінювали живильне середовище (на 15-ту добу культивування) на відповідне середовище диференціювання. Кількість диференційованих клітин в адіпогенному (Sudan IV) та хондрогенному (Toluidine blue) напрямках підраховували у світловому мікроскопі та визначали їх відсоток до загальної кількості клітин. Для статистичної обробки результатів використовували t-критерій Стьюдента та програму «Excel» («Microsoft», США).

Культури кММСК із жирової та хрящової тканин характеризувалися високим рівнем експресії CD44, CD73 CD90, CD105 ($\geq 90\%$) та низьким рівнем експресії гемопоетичного маркера CD 45 ($\leq 1\%$). Незалежно від джерела походження (жирова та хрящова тканини) кММСК зберігали здатність до адгезії, проліферації та спрямованого хондрогенного диференціювання ($(69.5 \pm 5.8)\%$ та $(78.2 \pm 8.5)\%$ відповідно). Слід зазначити, що культури кММСК із хрящової тканини мали нижчу здатність до спрямованого адіпогенного диференціювання ($(28.9 \pm 4.8)\%$), ніж кММСК із жирової тканини ($(62.7 \pm 5.3)\%$).

Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки методики застосування кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у клінічній практиці для лікування уражень тканин опорно-рухового апарату.

Obtaining, cultivation and cryopreservation of mesenchymal stromal cells are the basic procedures for cell products used in regenerative medicine to treat many diseases. Morphological and functional characteristics of rat's cryopreserved multipotent mesenchymal stem cells (CrMMSC) derived from cartilage and adipose tissue were analyzed.

MMSC cultures obtained from rat's fat and cartilage were cryopreserved under protection of 10% DMSO and 20% FBS with cooling rate of 1 deg/min down to -80°C followed by plunging into liquid nitrogen. The thawing was done on water bath at 40°C up to the appearance of liquid phase. For phenotypic analysis the MMSCs after freezing and thawing were stained with mouse anti-rat CD45-FITC, CD44-FITC, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE monoclonal antibodies (BD Biosciences, USA) according to the manufacturer's instructions. For the directed differentiation of the studied cultures towards adipogenic and chondrogenic directions, the nutrient medium (15 days of cultivation) was changed to the corresponding differentiation medium. Number of differentiated cells in the adipogenic (Sudan IV) and chondrogenic (Toluidine blue) directions were counted with a light microscope and the percentage of the total number of cells was calculated. The results were processed with Student's t-test using Excel software.

Cryopreserved MMSCs derived from cartilage and adipose tissue revealed typical mesenchymal phenotype with high expression of CD44, CD90, CD105, CD73 ($\geq 90\%$) and low expression of hematopoietic marker CD45 ($\leq 1\%$). CrMMSCs regardless of the source of origin (fat and cartilage tissues) kept ability to adhesion, proliferation and potential to directed chondrogenic differentiation ($69.5 \pm 5.8\%$ and $78.2 \pm 8.5\%$ respectively). It should be noted that cartilage-derived MMSCs have lower capacity for directed differentiation in adipogenic direction ($28.9 \pm 4.8\%$) if compared with CrMMSCs from adipose tissue ($62.7 \pm 5.3\%$).

The obtained data can be used to substantiate and develop a technique for the application of cryopreserved multipotent mesenchymal stem cells in clinical practice to treat the damages of musculoskeletal system.