

## Вплив кріоконсервування на проліферативні характеристики і потенціал диференціювання культивованих клітин хоріона

UDC 611.013.84.085.23:615.014.41

E.I. GONCHARUK\*, N.A. VOLKOVA, V.I. GRISCHENKO

## Cryopreservation Effect on Proliferation Characteristics and Differentiation Potential of Cultured Chorion Cells

В роботі були досліджені 5 програм кріоконсервування культури клітин хоріона (ККХ), які відрізнялися швидкістю та часом охолодження. Визначали такі показники, як життєздатність, здатність до адгезії, проліферації та спрямованого диференціювання за допомогою культуральних методів, світлової та люмінесцентної мікроскопії. Програма, яка характеризується охолодженням до  $-6^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ , сидінгом з наступним охолодженням до  $-80^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю  $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  є такою, що забезпечує як добру збереженість популяції ККХ в цілому, так і виживання фракції мультипотентних клітин.

**Ключові слова:** кріоконсервування, культура клітин хоріона, життєздатність, проліферація, диференціювання.

В работе были исследованы 5 программ криоконсервирования культуры клеток хориона (ККХ), отличающиеся скоростью и временем охлаждения. Определяли такие показатели, как жизнеспособность, способность к адгезии, пролиферации и направленному дифференцированию при помощи культуральных методов, световой и люминесцентной микроскопии. Программа, характеризующаяся охлаждением до  $-6^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , сидингом с последующим охлаждением до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  обеспечивает как хорошую сохранность популяции ККХ в целом, так и выживание фракции мультипотентных клеток.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, культура клеток хориона, жизнеспособность, пролиферация, дифференцирование.

Five programs of chorion cell culture (ChCC) cryopreservation which differ by the cooling rate and duration have been studied in the work. The properties such as viability, adhesion, proliferation and directed differentiation were studied using culturing, light and fluorescence microscopy. The program comprising the cooling down to  $-6^{\circ}\text{C}$  with the rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , seeding with following cooling down to  $-80^{\circ}\text{C}$  with the rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  provides both high integrity of ChCC population and survival of the fraction of multipotent cells.

**Key words:** cryopreservation, chorion cell culture, viability, proliferation, differentiation.

На сьогодні вивчення стовбурових клітин – основний напрямок сучасних фундаментальних досліджень у галузі біомедичних клітинних технологій. Культивування і спрямоване диференціювання стовбурових клітин, отриманих з різних джерел, використовують у регенеративній медицині для відновлення функцій органів і тканин, які були втрачені внаслідок спадковості або набутої патології [10, 19]. Одним з джерел отримання стовбурових клітин є тканини фетоплацентарного комплексу, до яких відноситься і тканина раннього хоріона, що складається з клітин з різними морфологічними і функціональними характеристиками. Це гетерогенна популяція, до складу якої входять стромальні, епітеліальні і судинні елементи. У роботі використовували ворсинчасту частину тканини хоріона, із якої отримували суспензію клітин, що далі культивували. Моношарова культура клітин хоріона (ККХ) має фібробластоподібну морфологію, стабільний коефіцієнт проліферації та здатність до диференцію-

Nowadays a study of stem cells is main direction of current fundamental investigations in biomedical cell technologies. Culturing and directed differentiation of stem cells, derived from different sources are used in regenerative medicine for recovery of organ and tissue functions, lost due to inherited or acquired pathologies [10, 19]. Tissues of fetoplacental complex, including the one of early chorion, comprising the cells with various morphological and functional characteristics are one of the sources of stem cells. It is the heterogenic population, including stromal, epithelial and vesicular elements. The villous part of chorion tissue was used to obtain cell suspension, which was then cultured. Monolayer culture of chorion cells has fibroblast-like morphology, stable proliferation coefficient and ability to differentiate into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages, testifying to the presence of cell population with stem characteristics. According to the data [15], chorion cells of 2–4<sup>th</sup> passages comprise more than 95% of cells with  $\text{CD90}^+$ ,  $\text{CD73}^+$ ,  $\text{CD105}^+$

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини  
НАН України, м. Харків

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

\* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:  
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84, електронна пошта: goncharuk23@gmail.com

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: goncharuk23@gmail.com

вання у адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямках, що свідчить про наявність популяції клітин зі стовбуровими властивостями. За даними [15], до складу клітин хоріона 2–4 пасажів входять більш ніж 95% клітин з імунофенотипом CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> та майже не вміщують клітин з епітопами CD14, CD34, CD45. Це характеризує ККХ як цінний біотехнологічний об'єкт, який в перспективі може бути використаний для терапії при різних патологіях [13, 16]. Однак питання кріоконсервування культивованих клітин хоріона вивчені недостатньо.

Слід зазначити, що однією з важливих задач кріобіології є оптимізація протоколів кріоконсервування культур клітин. Швидкості охолодження, які забезпечують збереження культивованих клітин, за різними даними [4, 9, 18] варіюють від дуже повільних (0,5°C/хв) до більш швидких (10°C/хв). Як розчин для кріоконсервування свіжоізольованих і культивованих клітин використовують суміші, які складаються з кріопротектора, живильного середовища та додаткових компонентів. Склад і відсоток кожної складової частини кріококтейлю є індивідуальним для кожної культури клітин. У зв'язку з цим пошук оптимальних умов кріоконсервування клітинних ліній, до складу яких входять стовбурові клітини, викликає особливий інтерес як до розробки ефективних способів кріоконсервування, так і дослідження кріочутливості клітин.

Мета роботи – дослідити вплив низькотемпературного консервування на морфофункціональні властивості ККХ.

### Матеріали і методи

Тканини для дослідження отримували з післяабортного матеріалу 6–12 тижнів гестації у випадках, коли вагітність переривали при відсутності патології розвитку чи інфікованості ембріона (згідно з договором про наукову співпрацю між ДП „Міжвідомчий науковий центр НАН, АМН і МОЗ України” і Інститутом проблем кріобіології і кріомедицини НАН України). Тканини використовували з експериментальною метою відповідно до діючого законодавства України та інформованої згоди донора.

Суспензію клітин ворсинчастої частини тканини хоріона людини одержували за допомогою ферментативної дезагрегації [1]. Отриману суспензію клітин висівали в культуральні флакони площею 25 см<sup>2</sup> (“РАА”, Австрія). Щільність посіву клітин становила 1×10<sup>3</sup> клітин на см<sup>2</sup>. Культивування клітин проводили за методом, який забезпечує адгезію стромальної фракції до культурального пластику з наступним видаленням фракції неадгезивних клітин. Як жи-

immune phenotype and almost do not contain the cells with CD14, CD34 and CD45 epitopes. It characterizes ChCC as the valuable biotechnological object, which may be used in perspective therapies of different pathologies [13, 16]. However, the task about cryopreservation of cultured chorion cells has been studied insufficiently.

It should be noted that one of the important tasks of cryobiology is optimization of cell culture cryopreservation protocols. The cooling rates providing the integrity of cultured cells, according to the reported data [4, 9, 18] vary from very slow (0.5°C/min) to faster (10°C/min) ones. The mixtures, comprising cryoprotectant, nutrient medium and additional components were used as the solutions for cryopreservation of freshly-isolated and cultured cells. The composition as well as the percentage of each component of cryomixture is specific for each cell culture. Herewith the search of optimal conditions of cell lines' cryopreservation, including stem cells, generates a specific interest not only for development of effective methods of cryopreservation, but also study of cell cryosensitivity.

The research aim is to study the effect of low temperature preservation on morpho-functional properties of ChCC.

### Materials and methods

Tissues for the research were derived from post-abortive material of 6–12 weeks of gestation in the cases when pregnancy was terminated at the absence of either growth pathology or embryonal contamination (according to the agreement of scientific collaboration between State Enterprise "Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Academy of Medical Sciences and Ministry of Health Care of Ukraine" and Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine). Tissues were used in experiments according to the current legislation of Ukraine and donor's informed consent.

Cell suspension of villous part of human chorion tissue was derived with enzymatic disaggregation [1]. The derived cell suspension was seeded into cultural flasks of 25 cm<sup>2</sup> (PAA, Austria). Density of cell plating made 1×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>. Cell culturing was carried-out by the method, providing adhesion of stromal fraction to cultural plastic with further removal of fraction of non-adhesive cells. The IMDM medium (Sigma, USA) supplemented with antibiotic (50 U/ml of kanamycin) and 10% fetal calf serum was used as nutrient medium. The nutrient medium was changed each 3 days. In the work the standard conditions of culturing at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with Sanyo incu-

вильне середовище використовували середовище IMDM ("Sigma", США) з додаванням розчину антибіотиків (канаміцин 50 од/мл) і 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби. Живильне середовище змінювали кожні 3 доби. У роботі були використані стандартні умови культивування при 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> з використанням інкубатора Sanyo (Японія). У роботі досліджували ККХ 2-го пасажу. Оцінку їх морфологічних характеристик проводили за допомогою світлової мікроскопії. При досягненні 75% конфлюєнта в первинних культурах проводили їх пасивування з наступним кріоконсервуванням. Розчином кріоконсервування було ростове середовище IMDM з додаванням 25% ембріональної сироватки (ЕС; "HyClone", США) та 10% ДМСО [3, 12]. Як контейнери для заморожування використовували кріопробірки ("Nunc", США) об'ємом 1 мл. Кріоконсервування здійснювали на програмному заморожувачі ЗПМ-1 (СКТБ з ДВ ІПКіК НАНУ). Проведено порівняння 5 варіантів заморожування ККХ, які за даними літератури успішно застосовують для кріоконсервування клітин культур різних типів [4, 13, 17]:

програма 1 – охолодження від 25 до –30°C зі швидкістю 0,5°C/хв;

програма 2 – охолодження від 25 до –30°C зі швидкістю 1°C/хв;

програма 3 – охолодження від 25 до –10°C зі швидкістю 1°C/хв, з подальшим охолодженням до –80°C зі швидкістю 10°C/хв;

програма 4 – охолодження від 25 до –5°C зі швидкістю 1°C/хв, з наступним охолодженням до –80°C зі швидкістю 10°C/хв;

програма 5 – охолодження від 25 до –6°C зі швидкістю 1°C/хв, з наступним сидінгом, який здійснювали шляхом додавання надмірної кількості азоту до камери та охолодженням до –80°C зі швидкістю 10°C/хв.

Останній етап усіх програм – занурення у рідкий азот.

Усі кріоконсервовані зразки зберігалися в умовах низькотемпературного банку на протязі 2-х тижнів, відігрівали їх на водяній бані при 40°C до рідкої фази. Досліджували деконсервовані клітини у вигляді суспензії. Видалення кріопротектора проводили за допомогою додавання розчину Хенкса, який десятикратно перевищував об'єм суспензії з подальшим центрифугуванням. Далі осад переводили до середовища Хенкса об'ємом 1 мл при температурі 25°C на 30 хв. Контролем була не кріоконсервована суспензія ККХ. В експериментальних зразках визначали відсоток життєздатних клітин за допомогою тесту на виключення трипанового синього. Для оцінки функціонального стану ККХ після кріо-

bator (Japan) were used. ChCC of the 2<sup>nd</sup> passage were studied in the work. Estimation of their morphological characteristics was carried-out with light microscopy. When reaching of 75% confluent in primary cultures their passaging and further cryopreservation were carried-out. Cryopreservation solution was the growth medium IMDM with adding 25% fetal serum (FS, HyClone, USA) and 10% DMSO [3, 12]. The 1 ml cryotubes (Nunc, USA) were the containers for freezing. Cryopreservation was carried-out with programmable freezing device ZPM-1 (Special Designing and Technical Bureau of IPC&C of NAS of Ukraine). The following 5 variants of freezing ChCC were compared, which according to literature data [4, 13, 17] were successfully used in cryopreservation of variety of cultured cells:

program 1: cooling from 25 down to –30°C with rate of 0.5°C/min;

program 2: cooling from 25 down to –30°C with rate of 1°C/min;

program 3: cooling from 25 down to –10°C with rate of 1°C/min with further cooling down to –80°C with rate of 10°C/min;

program 4: cooling from 25 down to –5°C with rate of 1°C/min with further cooling down to –80°C with rate of 10°C/min;

program 5: cooling from 25 down to –6°C with rate of 1°C/min with further crystal seeding by means of adding the surplus nitrogen into the chamber, and cooling down to –80°C with rate of 10°C/min.

The last stage of all the programs was plunging into liquid nitrogen.

All the cryopreserved samples were stored under low temperature bank conditions during 2 weeks, thawed on water bath at 40°C to a liquid phase. Investigations were carried-out in thawed cell suspensions. Cryoprotectant was removed by adding ten-fold volume of Hanks' solution and following centrifugation. Then the sediment was transferred into 1 ml Hanks' solution at 25°C for 30 min. The control was non-frozen-thawed ChCC suspension. In the experimental samples the percentage of viable cells was assessed with the trypan blue exclusion test. For estimation of functional state of ChCC after cryopreservation the activity of mitochondria was investigated with staining by potential-dependent fluorescent probe JC-1 (Molecular Probes, USA) [6, 12]. JC-1 staining of the control and frozen-thawed cells was assessed by means of inverted fluorescent microscope Olympus IX71 (Japan). The percentage of cells with green and orange fluorescence was counted. Cell adhesion efficiency was found during 24 hrs after starting the culture [2, 4]. Proliferation coefficient was estimated by counting the cell number and further determination of its incre-

консервування вивчали активність мітохондрій з використанням потенціал-залежного люмінесцентного зонда JC-1 ("Molecular Probes", США) [6, 12]. Забарвлення контрольних і кріоконсервованих клітин люмінесцентним зондом JC-1 оцінювали за допомогою флуоресцентного інвертованого мікроскопа Olympus IX71 (Японія). Підраховували відсоток клітин, що люмінесціювали зеленим або помаранчевим кольором. Ефективність адгезії клітин визначали в динаміці на протязі 24 год після початку культивування [2, 4]. Коефіцієнт проліферації визначали шляхом підрахунку клітин для визначення приросту їх кількості у випадково обраних полях зору в динаміці [1]. Для визначення здатності до диференціювання кріоконсервованих клітин культури хоріона змінювали живильне середовище (на 15-у добу культивування) на середовище диференціювання в адипогенному напрямку, до складу якого входили IMDM, 1% EC,  $10^{-7}$ М дексаметазону ("Sigma", США),  $10^{-9}$ М інсуліну ("Фармак", Україна). Подальше культивування проводили на протязі 3-х тижнів зі зміною середовища 2 рази на тиждень. Для підтвердження адипогенного диференціювання *in vitro* клітини фарбували Sudan IV ("Fluka", Німеччина). Контролем спонтанного диференціювання були клітини, культивовані у відсутності спеціальних індукторів. За допомогою світлової мікроскопії визначали позитивно профарбовані адипогенні клітини.

При статистичній обробці результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз і t-критерій Стьюдента за допомогою програми MS Excel.

### Результати та обговорення

Перший етап роботи – дослідження температури кристалізації розчину кріоконсервування для попередження ймовірного переохолодження зразка для даного типу контейнера і об'єму клітинної суспензії. За отриманими термограмами була встановлена температура кристалізації експериментальних зразків ( $T_{кр} = -6,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ). Оскільки для кріоконсервування клітинних культур використовують головним чином 2- або 3-етапне заморожування, нами були обрані дві програми 2-етапного та три – 3-етапного заморожування.

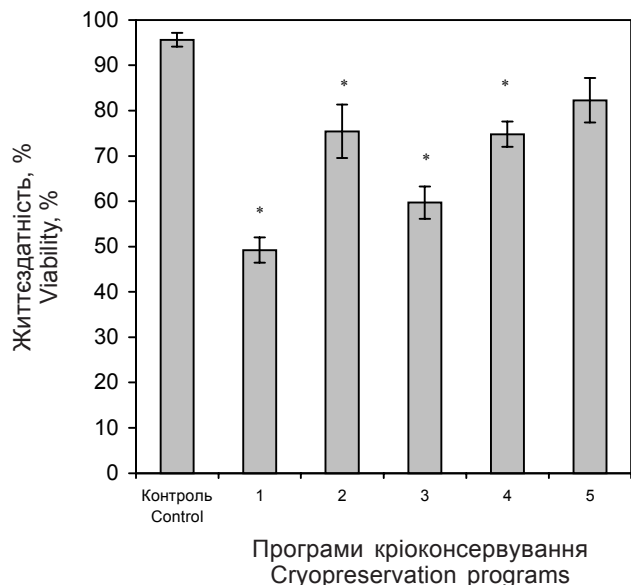
Показник життєздатності контрольної ККХ становив  $92,3 \pm 4,2\%$ . Результати визначення життєздатності клітин після кріоконсервування за вищезазначеними програмами наведені на рис. 1. Кількість життєздатних клітин при застосуванні програми 1 знижувалася у 1,8, програми 2 – у 1,25, програми 3 – у 1,5, програми 4 – у 1,3, програми 5 – у 1,2 рази відносно контрольних зразків. Таким

ment in randomly selected fields in dynamics [1]. For examining the ability of cryopreserved ChCC to differentiate the nutrient medium was changed (by 15th day of culture) for medium of differentiation into adipogenic lineage, comprised IMDM, 1% FS,  $10^{-7}$  M dexamethasone (Sigma, USA) and  $10^{-9}$  M insulin (Farma, Ukraine). Further culturing was carried-out during 3 weeks with changing the medium twice a week. To confirm the *in vitro* adipogenic differentiation the cells were stained with Sudan IV (Fluka, Germany). As the control for spontaneous differentiation served the cells cultured in the absence of special inducers. The staining of the cells was assessed with light microscope.

The results were processed with one-way ANOVA test and Student's t-criterion using MS Excel.

### Results and discussion

The first stage of the work is the study of crystallization temperature of cryopreservation solution for prevention of probable overcooling of the sample for each type of container and volume of cell suspension. Cryopreservation solution consisted of 10% DMSO, 25% FS in IMDM. According to the thermograms there were established the crystallization temperature of experimental samples ( $T_{cr} = -6.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ). We selected two programs of two-step and three programs of three-step freezing, whereas two-step or three-step freezings are usually used for cryopreservation of cell cultures.



**Рис. 1.** Життєздатність кріоконсервованих ККХ ( $n = 6, M \pm m$ ); \* – вірогідно відносно контролю ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Viability of cryopreserved ChCC ( $n = 6, M \pm m$ ); \* – statistically significant differences comparing to the control ( $p < 0.05$ ).

чином, після заморожування-відігріву показано зниження кількості життєздатних клітин у всіх розглянутих випадках.

Люмінесцентний барвник JC-1 відображує енергетичний стан мітохондрій. Він характеризується зеленим світінням, а при збільшенні заряду на мембранах мітохондрій молекули барвника формують J-агрегати, що супроводжується появою помаранчового світіння [12]. Дані люмінесцентної мікроскопії показали, що ККХ мають  $94,5 \pm 7,1\%$  світіння в помаранчовій зоні спектра, що свідчить про високий енергетичний стан культури клітин. Після кріоконсервування в клітинах хоріона даний показник мав тенденцію до зниження. Так,  $64,3 \pm 2,8$  та  $78,2 \pm 3,4\%$  клітин, кріоконсервованих за програмами 1 та 2 відповідно, мали світіння в помаранчовій зоні спектра, що вірогідно нижче, ніж показник у контрольній групі. Кріоконсервування ККХ за програмами 3, 4 та 5 також призводило до зниження досліджуваного показника: високу енергетичну активність мітохондрій мали  $72,5 \pm 5,1$  та  $76,4 \pm 4,5\%$  клітин відповідно.

Після добової реабілітації у клітин, кріоконсервованих за програмами 2 і 5, відбулося відновлення показників світіння до значень контрольних зразків.

Подальшим етапом дослідження було спостереження за адгезією і наступною проліферативною активністю деконсервованих ККХ. Проведені експерименти показали, що застосування програм 2 та 5 давало позитивний результат (табл. 1). Більшість клітин прикріплювалися до поверхні культурального пластику на 24-у годину спостереження. При кріоконсервуванні за програмами 1 і 3 досліджуваний показник був вірогідно нижче значень контрольних зразків. Клітини мали округлу форму, лише у деяких спостерігали відростки. Відсутність характерних ознак розпластування на протязі першої доби після посіву відображає, ймовірно, функціональні ушкодження клітин, які були отримані в процесі кріоконсервування. Таким чином, адгезія, що є першим етапом процесу проліферації клітин, може бути використана поряд з оцінкою енергетичного стану мітохондрій як тести скринінга ефективності програми заморожування.

Після спостереження за процесами адгезії кріоконсервованих ККХ було проведено дослідження проліферативних характеристик культури протягом

**Таблиця 1.** Ефективність прикріплення ККХ до поверхні культурального пластику, % (n = 6, M ± m)

**Table 1.** Efficiency of cryopreserved ChCC adhesion to culture plastics, % (n = 6, M ± m)

Програма кріоконсервування Cryopreservation program	Час спостереження, години Observation term, hrs			
	1	3	8	24
Контроль Control	54 ± 3	89 ± 5	90 ± 2	98 ± 6
1	8 ± 6*	30 ± 2*	41 ± 5*	49 ± 4*
2	48 ± 3	66 ± 3*	78 ± 7	92 ± 5
3	12 ± 6*	25 ± 4*	47 ± 5*	50 ± 4*
4	48 ± 5	45 ± 2*	60 ± 4*	78 ± 3*
5	50 ± 2	71 ± 6	84 ± 7	88 ± 8

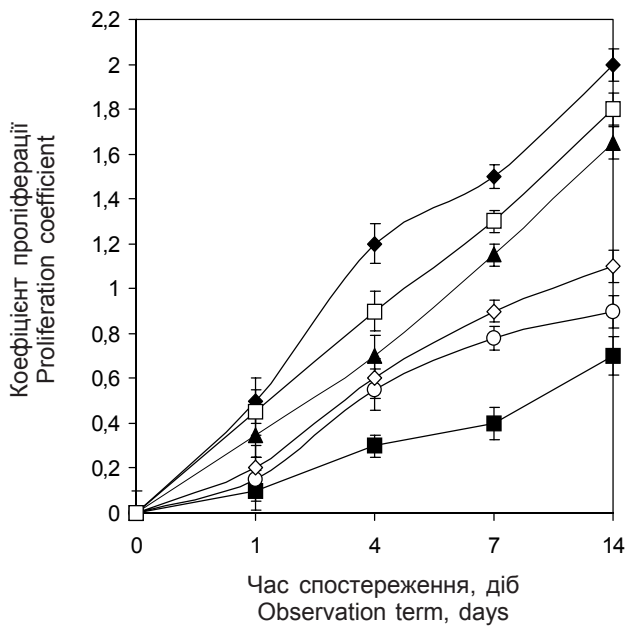
**Примітка:** \* – вірогідно відносно нативного контролю, p < 0,05.

**Note:** \* – statistically significant in respect of the native control, p < 0.05

Viability index of the control ChCC made  $92.3 \pm 4.2\%$ . The found results of cell viability after freeze-thawing according to the above-mentioned programs are shown in Fig. 1. When using the program 1 a number of viable cells reduced in 1.8, program 2 did in 1.25, program 3 diminished in 1.5, program 4 did in 1.3 and program 5 in 1.2 times comparing to the control samples. Thus, after freeze-thawing the reduction of number of viable cells was shown in all analyzed cases. Fluorescent dye JC-1 reflects an energetic state of mitochondria. It is characterized with a green luminescence, and if charge on mitochondria membranes increases the dye molecules form J-aggregates, that is accompanied with the appearance of orange luminescence [12]. The data of fluorescence microscopy have shown that ChCC have  $94.5 \pm 7.1\%$  of cells with fluorescence in orange bandwidth that testifies to a high energetic state of cell culture. Cryopreservation of chorion cells lead to a tendency of this index reduction. Herewith  $64.3 \pm 2.8$  and  $78.2 \pm 3.4$  of cells cryopreserved according to the programs 1 and 2, correspondingly had a fluorescence in orange bandwidth. Cryopreservation of ChCC according to the programs 3, 4 and 5 also resulted in a reduction of the studied index: high energetic activity of mitochondria had  $72.5 \pm 5.1$  and  $76.4 \pm 4.5\%$  of cells, correspondingly.

After 24 hrs rehabilitation in the cells cryopreserved according to the programs 2 and 5 reversion of the fluorescence to the control values occurred.

The further stage of research was observation of adhesion and following proliferative activity of frozen-thawed ChCC. The carried out experiments showed that the application of programs 2 and 5 gave a posi-



**Рис. 2.** Динаміка росту ККХ, кріоконсервованих за різними програмами після деконсервації ( $n = 6$ ,  $M \pm m$ ): ◆ – контроль; програми: ■ – 1; ▲ – 2; ○ – 3; ◇ – 4; □ – 5.  
**Fig. 2.** Growth dynamics of cryopreserved ChCC according to the different programs after freeze-thawing ( $n = 6$ ,  $M \pm m$ ): ◆ – control; programs: ■ – 1; ▲ – 2; ○ – 3; ◇ – 4; □ – 5.

14 днів (рис. 2). Морфологічне вивчення ККХ, кріоконсервованих за програмами 1, 3 і 4, при подальшому культивуванні показало зниження кількості клітин, які прикріпилися протягом першої доби культивування. Крім того, спостерігали виражені зміни у морфології клітин, що проявлялися у неоднорідній щільності цитоплазми, наявності 2-3 відростків з додатковими розгалуженнями на різних полюсах клітини. Іншу картину спостерігали в клітинах, які були кріоконсервовані за програмами 2 і 5. Клітини були веретеноподібної та трикутної форми з однорідною щільністю цитоплазми. В цих випадках спостерігалось збереження адгезивної фракції клітин з наступною проліферацією.

Таким чином, відзначався активний ріст клітин, які були попередньо кріоконсервовані за програмами 2 і 5, що корелює з наведеними вище показниками життєздатності, адгезії, енергетичного стану мітохондрій. Слід зазначити, що ріст культур, консервованих за іншими програмами, був уповільнений або взагалі відсутній. У всіх розглянутих випадках кріоконсервовані ККХ мали деяке запізнення у швидкості утворення моношару по відношенню до контрольної ККХ. У разі оптимальних програм 2 і 5 це запізнення становило  $3 \pm 1$  доба, в субоптимальних випадках (програма 4) –  $5 \pm 2$  доби, в незадовільних (програми 1 та 3) –  $7 \pm 2$  доби.

Дослідження впливу кріоконсервування на проліферацію та потенціал диференціювання ККХ важ-

тливим результатом (Таблиця 1). Найбільше клітин прикріпилося до поверхні культурних пластиків до 24-го годинного спостереження. Після кріоконсервації за програмами 1 і 3 досліджувані показники були значно нижчими за контрольні значення. Клітини мали округлу форму, тільки в деяких з них спостерігалися виступи. Відсутність виражених ознак сплюснення клітин на перший день після засівання клітин, ймовірно, свідчить про функціональні пошкодження клітин внаслідок кріоконсервації. Таким чином, адгезія клітин – перший етап клітинної проліферації, який можна використовувати разом з методом оцінки енергетичного стану мітохондрій як екранінг-тест на ефективність програм кріоконсервації.

Після спостереження за адгезією кріоконсервованих ChCC вивчення проліферативних характеристик протягом 14 днів культивування було виконано (рис. 2). Морфологічне дослідження ChCC, кріоконсервованих за програмами 1, 3 і 4, під час подальшого культивування показало зменшення кількості клітин, які прикріпилися протягом першого дня культивування. Крім того, спостерігали виражені зміни у морфології клітин, що проявлялися у неоднорідній щільності цитоплазми, наявності 2-3 відростків з додатковими розгалуженнями на різних полюсах клітини. Іншу картину спостерігали в клітинах, які були кріоконсервовані за програмами 2 і 5. Клітини мали веретеноподібну та трикутну форму з однорідною щільністю цитоплазми. В цих випадках спостерігалось збереження адгезивної фракції клітин з наступною проліферацією.

Таким чином, відзначався активний ріст клітин, які були попередньо кріоконсервовані за програмами 2 і 5, що корелює з наведеними вище показниками життєздатності, адгезії, енергетичного стану мітохондрій. Слід зазначити, що ріст культур, консервованих за іншими програмами, був уповільнений або взагалі відсутній. У всіх розглянутих випадках кріоконсервовані ККХ мали деяке запізнення у швидкості утворення моношару по відношенню до контрольної ККХ. У разі оптимальних програм 2 і 5 це запізнення становило  $3 \pm 1$  доба, в субоптимальних випадках (програма 4) –  $5 \pm 2$  доби, в незадовільних (програми 1 та 3) –  $7 \pm 2$  доби.

Дослідження впливу кріоконсервування на проліферацію та потенціал диференціювання ККХ важ-

тливим результатом (Таблиця 2). Найбільше клітин прикріпилося до поверхні культурних пластиків до 24-го годинного спостереження. Після кріоконсервації за програмами 1 і 3 досліджувані показники були значно нижчими за контрольні значення. Клітини мали округлу форму, тільки в деяких з них спостерігалися виступи. Відсутність виражених ознак сплюснення клітин на перший день після засівання клітин, ймовірно, свідчить про функціональні пошкодження клітин внаслідок кріоконсервації. Таким чином, адгезія клітин – перший етап клітинної проліферації, який можна використовувати разом з методом оцінки енергетичного стану мітохондрій як екранінг-тест на ефективність програм кріоконсервації.

Після спостереження за адгезією кріоконсервованих ChCC вивчення проліферативних характеристик протягом 14 днів культивування було виконано (рис. 2). Морфологічне дослідження ChCC, кріоконсервованих за програмами 1, 3 і 4, під час подальшого культивування показало зменшення кількості клітин, які прикріпилися протягом першого дня культивування. Крім того, спостерігали виражені зміни у морфології клітин, що проявлялися у неоднорідній щільності цитоплазми, наявності 2-3 відростків з додатковими розгалуженнями на різних полюсах клітини. Іншу картину спостерігали в клітинах, які були кріоконсервовані за програмами 2 і 5. Клітини мали веретеноподібну та трикутну форму з однорідною щільністю цитоплазми. В цих випадках спостерігалось збереження адгезивної фракції клітин з наступною проліферацією.

ливо як для розуміння механізмів регуляції процесів проліферації та диференціації процесів клітин-попередників, так і для розробки методів низькотемпературного консервування, які забезпечують збереження стовбурової фракції досліджених клітин.

Наступним етапом роботи було дослідження впливу кріоконсервування на здатність до диференціювання *in vitro* (табл. 2). Для доказу збереження “стовбуровості” ми обрали тест диференціювання в адипогенному напрямку, який відрізняється швидкістю та простотою постановки.

Перші ознаки адипоцитарного диференціювання спостерігали на 5–7 добу, це виражалось в зміні морфології клітин (округлість, зернистість цитоплазми). Через 21 добу після початку адипоцитарного диференціювання цитохімічне фарбування кріоконсервованих ККХ (програма 5) барвником Sudan IV показало наявність ліпідних крапель помаранчового кольору в цитоплазмі більш ніж  $58 \pm 5\%$  клітин, що свідчить про диференціювання в заданому напрямку. При цьому у морфології контрольних зразків зазначених змін не спостерігалось. Слід відзначити, що більшу здатність до диференціювання в адипоцитарному напрямку мали тонкі веретеноподібні клітини [8]. Отримані результати свідчать, що кріоконсервовані ККХ, так само як і контрольні ККХ, здатні до диференціювання у мезенхімально-мезодермальному напрямку. Кількісно ця здатність у клітин, кріоконсервованих за програмою 5, суттєво не відрізнялася від контрольних зразків і становила  $63 \pm 6\%$ . При цьому розглянутий показник у ККХ, кріоконсервованих за іншими програмами, був незначним, або відсутнім.

Найкращими результатами характеризувалась програма 5, яка відрізнялася від інших програм заморожування наявністю сидінгу. Незадовільні результати, отримані для інших використаних програм, можливо пов'язані з переохолодженням. Цікаві результати, отримані після кріоконсервування за програмою 2, при якій, незважаючи на повільну швидкість охолодження, переохолодження внутрішньоклітинного вмісту, очевидно, не мало місця. Отримані дані дозволяють вважати, що ККХ характеризуються досить високою чутливістю до цього негативного параметра процесу кріоконсервування.

Основне завдання розробки методу кріоконсервування полягає в забезпеченні збереженості морфофункціональних властивостей об'єкта, який підлягає впливу низьких температур. Результати представлених досліджень кріоконсервованих ККХ узгоджуються з результатами [7, 17] та свідчать про збереження їх проліферативних властивостей і потенціалу до диференціювання після кріоконсер-

**Таблиця 2.** Вплив кріоконсервування на адипогенні властивості кріоконсервованих ККХ ( $n = 6, M \pm m$ )  
**Table 2.** Cryopreservation effect on adipogenic properties of cryopreserved ChCC ( $n = 6, M \pm m$ )

Програма кріоконсервування Cryopreservation program	Наявність позитивних клітин по фарбуванню Sudan IV Presence of Sudan IV positive cells	
	Спонтанне диференціювання	Індуковане диференціювання
Контроль Control	–	+
1	–	–
2	–	±
3	–	–
4	–	±
5	–	+

**Примітка:** “+” – диференціювання понад 50% клітин; “±” – диференціювання менш ніж 30% клітин; “–” – відсутність диференціювання.

**Note:** “+” differentiation above 50% of cells; “±” – differentiation below 30% of cells; “–” – no differentiation.

cell morphology (roundness and granularity of cytoplasm). In 21 day after beginning the adipocyte differentiation the cytochemical staining of cryopreserved ChCC (program 5) with Sudan IV showed the presence of orange lipid droplets in the cytoplasm of more than  $58 \pm 5\%$  of cells, testifying about differentiation in the given direction. Herewith no changes were observed in morphology of the control samples. It has been noted that thin spindle-like cells had higher capacity for adipocyte differentiation [8]. The obtained results testify about the facts that cryopreserved ChCC as well as control ChCC are capable of mesenchymal-mesodermal differentiation. Quantitatively this capacity in cells cryopreserved according to the program 5 did not significantly differ from the control samples and was  $63 \pm 6\%$ . Herein the examined index in ChCC, cryopreserved according to the other programs was either insignificant or quite absent.

Program 5 was characterized with the best results, differing from other freezing programs with application of ice crystal seeding procedure. The unsatisfactory results obtained for other programs testify about the presence of overcooling. Interesting results obtained after cryopreservation according to the program 2 where in spite of slow rate was no overcooling present. The obtained data enable to assume that ChCC are characterized with sufficiently high sensitivity to this negative parameter of cryopreservation.

The main task of cryopreservation methods development consists in providing the preservation of

вування. Культивовані клітини хоріона характеризуються імунофенотипом мультипотентних мезенхімальних клітин і мають безперечні перспективи в галузі клітинної терапії [10, 13]. Результати, отримані в даній роботі, можуть бути основою для створення кріобанку перспективних ліній клітин з можливістю їх наступного використання для потреб біотехнології.

### Висновки

Досліджено вплив низькотемпературного консервування на такі морфофункціональні властивості ККХ, як життєздатність, адгезія, проліферація та спрямоване диференціювання. Розроблено оптимальний метод кріоконсервування культури клітин хоріону. Програма 5, яка складається з охолодження до  $-6^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ , сидінгу з наступним охолодженням до  $-80^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю  $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  забезпечує як добру збереженість популяції ККХ в цілому, так і виживання фракції мультипотентних клітин.

### Література

1. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков.– М.: Мир, 1983.– 264 с.
2. *Боценовский В.А., Барышников А.Ю.* Молекулы клеточной адгезии человека // *Успехи совр. биологии.*– 1994.– Т. 144, №6.– С. 741–753.
3. *Волкова Н.А., Петренко Т.Ф., Гончарук Е.И., Грищенко В.И.* Кріоконсервована суспензія кліток хоріона як перспективний ресурс для біотехнологій // *Ветеринарна патологія.*– 2007.– №4.– С. 236–238.
4. *Гулевский А.К., Трифонова А.В., Петренко Т.Ф., Лаврик А.А.* Воздействие фракции из кордовой крови крупного рогатого скота (до 5 кДа) на пролиферативную активность клеток *in vitro* после кріоконсервации // *Межвідомчий темат.-наук. збірник "Ветеринарна медицина"*.– 2008.– С. 147–153.
5. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.– М.: Наука, 1989.– 277 с.
6. *Методы культивирования клеток:* Сб. научных трудов / Под. ред. Г.П. Пинаева.– Л.: Наука, 1988.– 287 с.
7. *Скоробогатова Н.Г., Гришук В.П., Петренко А.Ю.* Роль переохлаждения в сохранении клоногенных свойств фибробластоподобных клеток-предшественников эмбриональной печени человека после кріоконсервирования // *Проблемы криобиологии.*– 2006.– Т. 16, №1.–С. 24–31.
8. *Суздальцев Ю.Г., Бурунова В.В., Вахрушев И.В. и др.* Сравнение способности к дифференцировке в ткани мезодермального происхождения мезенхимальных клеток человека, выделенных из разных источников // *Клеточные технологии в биологии и медицине.*– 2007.– №1.– С. 3–10.
9. *Bratanov M., Neronov A., Nikolova E.* Limbal explants from cryopreserved cadaver human corneas. Immunofluorescence and light microscopy of epithelial cells growing in culture // *Cryo-Letters.*– 2009.– Vol. 30, N3.– P. 183–189.
10. *Cargnoni A., Gibelli L., Tosini A. et al.* Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis // *Cell Transplant.*– 2009.– Vol.18, N4.– P. 405–422.

morphofunctional properties of bioobject suffering the low temperature effects. The obtained results of cryopreservation outcome for ChCC are conformed to data of other authors [7,17] and testify the preservation of their proliferative properties and differentiation potential after cryopreservation. Cultured chorionic cells are characterized by immune phenotype of multipotential mesenchymal cells and have doubtless perspectives in cell therapy [10, 13]. The results, obtained in this work, may ground the development of cryobanks for perspective cell lines and their further application in biotechnology.

### Conclusions

The effect of low temperature preservation on morphofunctional properties of ChCC such as viability, adhesion, proliferation and directed differentiation was studied. There has been developed the optimal method of cryopreservation for chorion cell culture. The program 5 comprising the cooling down to  $-6^{\circ}\text{C}$  with the rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , ice crystal seeding with following cooling down to  $-80^{\circ}\text{C}$  with the rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  provides both high integrity of ChCC population and survival of the fraction of multipotent cells.

### References

1. *Adams R.* Methods of cell culture for biochemists.– Moscow: Mir, 1983.– 264 p.
2. *Botsenovsky V.A., Baryshnikov A.Yu.* Molecules of human cell adhesion // *Uspekhi Sovr. Biologii.*– 1994.– Vol. 144, N6.– P. 741–753.
3. *Volkova N.A., Petrenko T.F., Goncharuk E.I., Grischenko V.I.* Cryopreserved suspension of chorion cells as perspective resource for biotechnologies// *Veterinarnaya Patologiya.*– 2007.– N4.– P. 236–238.
4. *Gulevsky A.K., Trifonova A.V., Petrenko T.F., Lavrik A.A.* Effect of bovine cord blood fraction (to 5 kDa) on cell proliferative activity *in vitro* after cryopreservation // *Mezhvidomchyy Temat. Nauk. Zbirnyk "Veterynarna meditsyna"*.– 2008.– P. 147–153.
5. *Dobretsov G.E.* Fluorescence probes during investigation of cells, membranes and lypoproteins.– Moscow: Nauka, 1989.– 277 p.
6. *Methods of cell culturing:* Coll. of Scientific Papers/ Ed. by G.P. Pinaeva.– Leningrad: Nauka, 1988.– 287 p.
7. *Skorobogatova N.G., Grishuk V.P., Petrenko A.Yu.* Role of overcooling in preserving clonogenic properties of fibroblast-like progenitor cells of human embryonic liver after cryopreservation // *Problems of Cryobiology.*– 2006.– N1.– P. 24–31.
8. *Suzdaltsev Yu.G., Burunova V.V., Vakhrushev I.V. et. al.* Comparison of ability to differentiation in tissue of mesodermal origin of human mesenchymal cells, derived from different sources // *Kletochnye tehnologii v biologii i meditsine.*– 2007.– N1.– P. 3–10.
9. *Bratanov M., Neronov A., Nikolova E.* Limbal explants from cryopreserved cadaver human corneas. Immunofluorescence and light microscopy of epithelial cells growing in culture // *Cryo-Letters.*– 2009.– Vol. 30, N3.– P. 183–189.



11. *Chin S.P., Poey A.C., Wong C.Y. et al.* Cryopreserved mesenchymal stromal cell treatment is safe and feasible for severe dilated ischemic cardiomyopathy // *Cytotherapy*.– 2010.– Vol. 12, N1.– P. 31–37.
12. *Ferrari A., Hannouche D., Oudina K. et al.* *In vivo* tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye // *J. Biomed. Mater. Res.*– 2001.– Vol. 56, N3.– P. 361–367.
13. *Haack-Sorensen M., Bindsløv L., Mortensen S. et al.* The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use // *Cytotherapy*.– 2007.– Vol. 9, N4.– P. 328–337.
14. *Kar M., Ghosh D., Sengupta J.* Molecular correlates of syncytialization in muscle and placenta // *Indian J. Physiol. Pharmacol.*– 2007.– Vol. 51, N4.– P. 311–325.
15. *Maddalena S., Elsa V., Lucia G. et al.* Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes // *J. Tissue Eng. Regen. Med.*– 2007.– Vol. 1, N4.– P. 296–305.
16. *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.
17. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science*.– 1999.– Vol. 284, N2.– P. 143–147.
18. *Woods E.J., Perry B.C., Hockema J.J. et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use // *Cryobiology*.– 2009.– Vol. 59, N2.– P. 150–157.
19. *Zippel N., Schulze M., Tobiasch E.* Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine // *Recent Patents on Biotechnology*.– 2010.– Vol. 4, N1.– P. 1–22.
10. *Cargnoni A., Gibelli L., Tosini A. et al.* Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis // *Cell Transplant.*– 2009.– Vol.18, N4.– P. 405–422.
11. *Chin S.P., Poey A.C., Wong C.Y. et al.* Cryopreserved mesenchymal stromal cell treatment is safe and feasible for severe dilated ischemic cardiomyopathy // *Cytotherapy*.– 2010.– Vol. 12, N1.– P. 31–37.
12. *Ferrari A., Hannouche D., Oudina K. et al.* *In vivo* tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye // *J. Biomed. Mater. Res.*– 2001.– Vol. 56, N3.– P. 361–367.
13. *Haack-Sorensen M., Bindsløv L., Mortensen S. et al.* The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use // *Cytotherapy*.– 2007.– Vol. 9, N4.– P. 328–337.
14. *Kar M., Ghosh D., Sengupta J.* Molecular correlates of syncytialization in muscle and placenta // *Indian J. Physiol. Pharmacol.*– 2007.– Vol. 51, N4.– P. 311–325.
15. *Maddalena S., Elsa V., Lucia G. et al.* Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes // *J. Tissue Eng. Regen. Med.*– 2007.– Vol. 1, N4.– P. 296–305.
16. *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.
17. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science*.– 1999.– Vol. 284, N2.– P. 143–147.
18. *Woods E.J., Perry B.C., Hockema J.J. et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use // *Cryobiology*.– 2009.– Vol. 59, N2.– P. 150–157.
19. *Zippel N., Schulze M., Tobiasch E.* Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine // *Recent Patents on Biotechnology*.– 2010.– Vol. 4, N1.– P. 1–22.

*Надійшла 13.04.2010*  
*Рецензент Н.О. Волкова*

*Accepted in 13.04.2010*