

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 шурів.

Культури ММСК, отримані з жирової і хрящової тканини шурів, кріоконсервували під захистом 10% ДМСО і 20% фетальної бичачої 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 хондрогенному 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.

Отримання, культивування та кріоконсервування мезенхімальних стромальних клітин є базовими процедурами для отримання продуктів, що використовуються в регенеративній медицині для лікування багатьох захворювань. Морфологічні та функціональні характеристики кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (CrMMSC) отриманих з хрящової та жирової тканин були проаналізовані.

ММСК культури отримані з жирової та хрящової тканини шурів, кріоконсервували під захистом 10% ДМСО і 20% FBS з швидкістю охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот. Відігрівання проводили у водній бані при температурі 40°C до появи рідкої фази. Для фенотипічного аналізу ММСК після заморожування та відігрівання забарвлювали моноклональними антитілами CD45-FITC, CD44-FITC, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE моноклональними антитілами (BD Biosciences, USA) згідно з інструкцією фірми-виробника. Для спрямованого диференціювання досліджуваних культур в адіпо- та хондрогенному 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).

Кріоконсервовані ММСК отримані з хрящової та жирової тканини шурів характеризувалися високим рівнем експресії CD44, CD90, CD105, CD73 ($\geq 90\%$) та низьким рівнем експресії гемопоетичного маркера CD45 ($\leq 1\%$). Незалежно від джерела походження (жирова та хрящова тканини) ММСК 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 ММСК із хрящової тканини мали нижчу здатність до спрямованого адіпогенного диференціювання ($(28,9 \pm 4,8)\%$), ніж ММСК 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.