

Влияние криоконсервирования на дифференцировочные свойства мезенхимальных стромальных клеток-предшественников фетальной печени и костного мозга взрослого человека

UDC 615.014.41:611.36.013.08:611.018.46.08

N.G. SKOROBOGATOVA, YU.A. PETRENKO, N.A., VOLKOVA, A.YU. PETRENKO*

Cryopreservation Effect on Differentiation Capacities of Mesenchymal Stromal Progenitor Cells from Human Fetal Liver and Adult Bone Marrow

Исследовано влияние криоконсервирования на остеогенные и адипогенные свойства субкультивированных *in vitro* мезенхимальных стромальных клеток, полученных из фетальной печени и костного мозга взрослого человека. Показано сохранение пролиферативных свойств и дифференцировочного потенциала после криоконсервирования исследуемых клеток-предшественников, включающего медленное 2-этапное замораживание под защитой ДМСО.

Ключевые слова: криоконсервирование, мезенхимальные стромальные клетки-предшественники, фетальная печень, костный мозг.

Досліджено вплив кріоконсервування на остеогенні і адипогенні властивості субкультивованих *in vitro* мезенхімальних стромальних клітин, отриманих з фетальної печінки і кісткового мозку дорослої людини. Показано збереження проліферативних властивостей і диференціовального потенціалу після кріоконсервування дослідних клітин-попередників, що включає повільне 2-етапне заморожування під захистом ДМСО.

Ключові слова: кріоконсервування, мезенхімальні стромальні клітини-попередники, фетальна печінка, кістковий мозок.

The cryopreservation influence on osteogenic and adipogenic capacities of expanded *in vitro* mesenchymal stromal cells derived from human fetal liver and adult bone marrow was investigated. Saving proliferative ability and differentiation potential of the progenitor cells after cryopreservation by 2-step slow freezing under Me₂SO protection was shown.

Key-words: cryopreservation, mesenchymal progenitor stromal cells, fetal liver, bone marrow.

К настоящему времени накоплено значительное количество данных, касающихся криобиологических характеристик клеток гемопоэтического ряда. Возможности же сохранения другого ценного пула, а именно мезенхимальных стромальных клеток (МСК), остаются менее изученными. Согласно современным представлениям этот пул включает мультипотентные стволовые клетки, а также их незрелые потомки с более ограниченными пролиферативно-дифференцировочными свойствами [7]. Для криоконсервирования МСК традиционно используют криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) [4, 6]. Однако гетерогенный состав популяций МСК обуславливает методические ограничения при оценке чувствительности наиболее ранних предшественников к действию криоконсервирования.

Цель исследования – определить влияние криоконсервирования на способность дифференцироваться *in vitro* в остеогенном и адипогенном направлениях мезенхимальных стромальных кле-

ток, полученных из пре- и постнатальных гемопоэтических источников (фетальной печени и костного мозга человека).

Материалы и методы

Объектом исследования служили фибробластоподобные клетки, изолированные из фетальной печени человека (ФПЧ) 8–11 недель гестации и костного мозга (КМ) взрослого человека. Первичную суспензию клеток получали из ФПЧ ферментативным методом [2] (n = 4), из КМ – путем вымывания физиологической средой из спонгиозной костной ткани (n = 4). Сохранность клеток определяли с помощью прижизненного окрашивания трипановым синим. Культивирование МСК проводили в монослое в среде alpha-MEM (Sigma, США), дополненной эмбриональной сывороткой (ЭС) крупного рогатого скота (БиолоТ, Россия). Для пассирования культур и одиночных колоний использовали смесь 0,05% трипсина и 0,004% раствора Версена.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Субкультивированные клетки ФПЧ и КМ криоконсервировали в 1 мл культуральной среды с 20 % ЭС и 10% ДМСО со скоростью 1°C/мин до -80°C с последующим погружением в жидкий азот. Криоконсервированные образцы хранили в жидком азоте в течение 4–6 месяцев. Клеточные суспензии отогревали на водяной бане при 37°C.

Культивирование колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) до и после криоконсервирования проводили согласно методу, описанному в работе [1]. Остеогенный и адипогенный потенциал мезенхимальных предшественников определяли *in vitro* при субкультивировании в индуктивных средах [8]. Остеогенные клетки выявляли по экспрессии щелочной фосфатазы, минерализацию внеклеточного матрикса оценивали с помощью окрашивания по Ван-Коссу, а адипогенные клетки – по окрашиванию Oil Red O [5]. Контролем на спонтанную дифференцировку служили клетки, культивированные без специальных индукторов. В условиях световой микроскопии определяли позитивно окрашенные остеогенные и адипогенные клетки. Все эксперименты проводили с тройным повтором.

Результаты сохранности клеток представлены как $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

Сохранность клеток, изолированных из ФПЧ и КМ, составляла $95,1 \pm 2,5$ и $90,2 \pm 3,7$ % соответственно. В первичной культуре были выявлены КОЕф в обеих группах. Посев 100 000–150 000 клеток/см² приводил к формированию фибробласто-подобными клетками 70% конфлуентного монослоя к 9-м суткам культивирования для клеток КМ и к 11–12-м суткам – для ФПЧ. После двукратного пассирования и культивирования в индуктивных средах стромальные клетки ФПЧ и КМ демонстрировали типичные признаки индуцированных адипо- и остеогенной дифференцировок (накопление липидных включений, позитивно окрашивающихся Oil Red O, у адипогенных клеток и экспрессия щелочной фосфатазы на фоне появления характерных полигональной и кубоидальной морфологии у дифференцирующихся остеогенных клеток). В контрольных культурах клеток ФПЧ спонтанных дифференцировок выявлено не было. В случае КМ при культивировании в ростовой среде без остеогенных индукторов обнаружено незначительное количество фибробластоподобных клеток, позитивных по окрашиванию на щелочную фосфатазу.

В настоящей работе было выявлено, что при предварительном субкультивировании и после-

Свойства субкультивированных мезенхимальных стромальных клеток-предшественников ФПЧ и КМ до и после криоконсервирования

Параметр	ФПЧ		КМ	
	до	после	до	после
Сохранность, %	$95,1 \pm 2,5$	$73,0 \pm 4,6$	$90,2 \pm 3,7$	$68,4 \pm 5,2$
Остеогенный потенциал	+	+	+	+
Адипогенный потенциал	+	+	+	+

дующем криоконсервировании стромальные клетки-предшественники ФПЧ сохраняли способность к остеогенной и адипогенной дифференцировкам *in vitro* (таблица). Эти данные свидетельствовали об устойчивости к действию криоконсервирования у субкультивированных МСК фетального происхождения.

Исследование влияния криоконсервирования на пролиферацию и дифференцировочный потенциал МСК взрослого человека важно как для понимания механизмов регуляции пролиферативно-дифференцировочных процессов стромальных предшественников, так и для разработки методов низкотемпературного консервирования исследуемых клеток. МСК КМ были получены из поликлональных субкультур (3-го пассажа) и в результате экспансии единичных колоний, криоконсервированы по 2-этапному протоколу, примененному для субкультивированных клеток ФПЧ. Криоконсервированные МСК КМ сохраняли колониеобразующую способность и дифференцировочные остеогенные и адипогенные свойства *in vitro* (таблица). Оценка минерализации матрикса с помощью окрашивания по Ван-Коссу подтвердила функциональную активность дифференцировавшихся остеобластов. В то же время в контрольных культурах были отмечены единичные ранние признаки спонтанной остеогенной дифференцировки.

Ранее нами была установлена чувствительность КОЕф ФПЧ к переохлаждению при медленном замораживании первичной суспензии [3]. Определено, что снижение уровня переохлаждения путем инициации кристаллообразования позволяет сохранить клоногенные МСК в первичной суспензии ФПЧ, способные к экспансии и направленным остео- и адипогенной дифференцировкам *in vitro* [8]. Анализ настоящих и ранее полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что МСК человека, свежеизолированные из раннего гемопоэтического источника (фетальной печени), более чувствительны к действию низкотемпературного

консервирования, в частности к переохлаждению, по сравнению с субкультивированными клетками. Для выяснения причин этих различий необходимы дополнительные исследования.

Результаты проведенных исследований субкультивированных *in vitro* МСК фетальной печени и КМ человека свидетельствуют о сохранении их пролиферативных свойств и дифференцировочного потенциала после криоконсервирования, включающего медленное 2-этапное замораживание под защитой ДМСО.

Литература

1. Грищенко В.И., Петренко А.Ю., Волкова Н.А., Скоробогатова Н.Г. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток-предшественников из эмбриональной печени человека в условиях *in vitro* // Доповіді Національної академії наук України.– 2005.– №2.– С. 138–141.
2. Демидова С.А., Левина Д.С., Блюмкин В.Н. Методические указания по работе с клеточными культурами.– М.: Ин-т вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, 1971.– С. 14–15.
3. Скоробогатова Н.Г., Грищук В.П., Петренко А.Ю. Роль переохлаждения в сохранении клоногенных свойств фибробластоподобных клеток-предшественников эмбриональной печени человека после криоконсервирования // Пробл. криобиологии.– 2006.– Т. 16, №1.– С. 24–31.
4. Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation // J. Cell. Biochem.– 1997.– Vol. 64, N2.– P. 278–294.
5. *Histological and histochemical methods. Theory and practice.* Second edition / Edited by J.A. Kilrnan.– Oxford: Pergamon Press, 1990.– 433 p.
6. Lee M.W., Choi J., Yang M. S. et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2004.– Vol. 320, N1.– P. 273–278.
7. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science.– 1999.– Vol. 284, N5411.– P. 143–147.
8. Skorobogatova N.G., Petrenko A.Yu. Colony-forming and differentiation properties of fibroblast-like progenitor cells from human fetal liver before and after cryopreservation under DMSO protection // Acta Biochimica Polonica.– 2007.– Vol. 54, Suppl. 2.– P. 27–28.

Поступила 01.07.2008