

Характеристика иммунофенотипа и дифференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека после криоконсервирования

UDC 615.014.41:611.018.46.08

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

Characterization of Immunophenotype and Differentiation Potential of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells after Cryopreservation

Стромальные клетки, изолированные из костного мозга (КМ) взрослого человека, после экспансии *in vitro* демонстрируют специфический иммунофенотип и способность к мультилинейной дифференцировке, свойственные мезенхимальным стволовым клеткам (МСК). Установлено, что криоконсервирование МСК КМ человека путем медленного двухступенчатого замораживания под защитой 10% ДМСО позволяет сохранить их иммунофенотип и способность к индуцированным *in vitro* остеогенной и адипогенной дифференцировкам.

Ключевые слова: криоконсервирование, мезенхимальные стромальные клетки, костный мозг человека, адипогенная и остеогенная дифференцировка, иммунофенотип.

Стромальні клітини, які були ізольовані з кісткового мозку (КМ) дорослої людини, після експансії *in vitro* демонструють специфічний імунофенотип та здатність до мультилінійного диференціювання, що є характерним для мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Встановлено, що криоконсервування МСК КМ людини шляхом повільного двоступінчастого заморожування під захистом 10% ДМСО дозволяє зберегти їхній імунофенотип та здатність до індукованого *in vitro* остеогенного та адипогенного диференціювань.

Ключові слова: криоконсервування, мезенхімальні стромальні клітини, кістковий мозок людини, адипогенне та остеогенне диференціювання, імунофенотип.

Stromal cells derived from adult human bone marrow (BM) after *in vitro* expansion demonstrate a specific immunophenotype and ability to multilineage differentiation, inherent to mesenchymal stromal cells (MSCs). It was established that cryopreservation of human BM MSCs by two-step freezing under protection of 10% DMSO enables to preserve their immunophenotype and ability to induced osteogenic and adipogenic differentiation *in vitro*.

Key words: cryopreservation, mesenchymal stromal cells, human bone marrow, adipogenic and osteogenic differentiation, immunophenotype.

Мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки (МСК) находят все более широкое применение в различных областях биологии и медицины благодаря их высокой способности дифференцироваться в различные типы клеток и низкой иммуногенности [3, 5, 7]. Показано, что МСК присутствуют во многих органах и тканях взрослого организма – костном мозге (КМ), коже, жировой, костной, мышечной тканях и др. [3, 4, 6, 9]. Однако в качестве "золотого стандарта" при оценке и сравнении биологического потенциала данного типа клеток, выделенных из разных источников, рассматривают МСК КМ взрослых доноров. В связи с этим актуально исследование морфофункциональных свойств МСК КМ после различных воздействий.

Криоконсервирование МСК КМ требует применения таких методических подходов, которые

Mesenchymal stem (stromal) cells (MSCs) have found a wide application in different fields of biology and medicine due to their high ability of differentiation into various cell types and low immunogenicity [3, 5, 7]. MSCs have been shown to be present in many organs and tissues of adult organism: bone marrow (BM), skin, adipose tissue, muscle *etc.* [3, 4, 6, 9]. However as "a gold standard" when estimating and comparing biological potential of cells, isolated from different sources, the BM MSCs of adult donors are considered. The study of morpho-functional properties of BM MSCs after different effects is an important point.

BM MSCs cryopreservation needs the application of methodical approaches allowing the maximum preservation of not only viability but also unique biological properties of these cells. Usually the BM MSCs are cryopreserved after sub-culturing by slow

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* 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:
yuripetrenko@cryo.org.ua.

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

позволяют максимально сохранять не только жизнеспособность, но и уникальные биологические свойства этих клеток. Обычно криоконсервирование МСК КМ проводят после предварительного субкультивирования путем медленного замораживания с применением криозащитных сред, содержащих диметилсульфоксид (ДМСО) [6, 8]. Необходимым этапом криобиотехнологического процесса является контроль стабильности иммунофенотипа и способности к направленной мультилинейной дифференцировке МСК КМ после криоконсервирования.

Цель работы – исследование иммунофенотипа и способности к направленным специфическим дифференцировкам мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека до и после криоконсервирования.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на КМ, полученном от взрослых доноров после их информированного письменного согласия, в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации по проведению биомедицинских исследований. Источником клеток были фрагменты спонгиозной ткани, которые извлекали в виде цилиндров диаметром 6–8 мм из гребня подвздошной кости с помощью инструментов для мозаичной хондропластики, что обеспечивало малую инвазивность процедуры. Первичную суспензию клеток получали вымыванием изотонической средой из костных цилиндров, затем ее центрифугировали при 150g в течение 10 мин. Ядросодержащие клетки из полученного осадка подсчитывали в камере Горяева с использованием 3%-й уксусной кислоты. Культивировали клетки в среде, дополненной 15% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота ("Биолот", Россия), 2 mM L-глутамин, 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ и абсолютной влажности. Первую замену среды осуществляли через 48 ч культивирования и далее – через каждые 3-е суток.

Культивированные МСК КМ 3–4-го пассажей криоконсервировали в культуральной среде, содержащей 20% ЭС и 10% ДМСО, со скоростью 1 градус/мин до –80°C по протоколу фирмы-производителя Cryo 1°C Freezing Container ("Nalgene", США) с последующим погружением в жидкий азот.

Образцы хранили при –196°C в течение 4–6 месяцев. Криоконсервированные образцы отогревали на водяной бане при 37°C. Для удаления криозащитной среды клеточные суспензии разбав-

freezing with the application of cryoprotective media, containing dimethyl sulfoxide (DMSO) [6, 8]. The essential stage of cryobiotechnological process is the post-thaw control of immunophenotype stability and ability to directed multi-lineage differentiation of BM MSCs.

The aim of this research was to investigate the immunophenotype and specific differentiations abilities of human bone marrow mesenchymal stromal cells prior to and after cryopreservation.

Materials and methods

The experiments were carried-out using BM, obtained from adult donors after their informed written consent in the accordance with the WMA declaration of Helsinki for medical research. As the source of the cells spongy tissue fragments were used. These fragments (6-8 mm cylinders) were isolated from iliac crest by the application of instruments for mosaic chondroplastics, which provided low invasiveness of the procedure. Primary cell suspension was obtained by washing-out from bone cylinders with isotonic medium, followed by centrifugation at 150g for 10 min. Nucleated cells from the obtained pellets were counted in Goryaev's chamber using 3% acetic acid. The cells were cultured in the medium supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) (Biolot, Russia), 2 mM L-glutamine, 50 units/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and absolute humidity. The first change of the medium was performed after 48 hrs of culturing and later every 3 days.

Cultured BM MSCs of the 3rd–4th passages were cryopreserved in the culture medium, supplemented by 20% FS and 10% DMSO with the cooling rate of 1 degree/min down to –80°C using Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene, USA) according to the manufacturing protocol with following plunging into liquid nitrogen.

The samples were stored at –196°C for 4–6 months. Cryopreserved samples were thawed on water bath at 37°C. To remove cryoprotective medium the cell suspensions were diluted with the culture medium, containing 10% FS in 1:10 ratio with following centrifugation (150g, 10 min). Cell pellets were re-suspended in a new portion of culture medium. The cell integrity was assessed by vital staining with trypan blue.

Freshly isolated and cryopreserved stromal cells were cultured for 3–4 passages, afterwards immunophenotyping and induction of osteo- and adipogenesis *in vitro* were performed. Vital control of the state of cell cultures was prepared daily using inverted microscope CETI (Belgium).

ляли средой культивирования, содержащей 10% ЭС, в соотношении 1:10 с последующим центрифугированием (150g, 10 мин). Клеточный осадок ресуспендировали в новой порции культуральной среды. Сохранность клеток оценивали с помощью прижизненного окрашивания трипановым синим.

Свежевыделенные и криоконсервированные стромальные клетки культивировали в течение 3–4-х пассажей, после чего проводили иммунофенотипирование и индукцию остео- и адипогенеза *in vitro*. Прижизненный контроль состояния клеточных культур осуществляли ежедневно с помощью инвертированного микроскопа “СЕТТ” (Бельгия).

Для иммунофенотипического анализа культивированные клетки окрашивали моноклональными антителами CD29-PE, CD45-PE, CD105-FITC (“Serotec”, Великобритания), CD34 Class II-FITC, CD38-RPE (“ДАКО”, Голландия), CD44-FITC, CD73-PE (“BD Biosciences”, США) согласно инструкции производителей, дважды отмывали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин в растворе Хэнкса и анализировали на проточном цитометре “FACS Calibur” (“BD Biosciences”, США).

Дифференцировочный потенциал МСК определяли *in vitro* при культивировании в специфичных индуктивных средах. Для индукции остеогенеза применяли среду alpha-MEM, содержащую 10% ЭС; 0,1 мкМ дексаметазона; 0,05 мМ аскорбиновой кислоты; 10 мМ глицерол-фосфата. Адипогенез индуцировали в среде alpha-MEM, дополненной 10% Adipogenic Stimulatory Supplements (“Stem Cell Technologies Inc.”, Канада). Клетки культивировали в течение 3-х недель, среду меняли через каждые 3-е суток.

Остеогенез выявляли по экспрессии щелочной фосфатазы и наличию минерализации внеклеточного матрикса (окрашивание по Ван Коссу) [10]. Адипогенную дифференцировку клеток определяли по накоплению нейтральных жиров (окрашивание Oil Red O) [10]. Контролем на спонтанную дифференцировку служили клетки, культивированные в ростовой среде без специальных индукторов.

Результаты и обсуждение

Полученные первичные культуры свежеизолированных стромальных клеток КМ были гетерогенными по составу и содержали незначительную примесь адгезивных гемопоэтических клеток, а также макрофагов, которые постепенно элиминировались в ходе культивирования. В первичной культуре стромальных клеток КМ были выявлены колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕф) с частотой 1–2 на 100 000 посеянных ядродержащих клеток [2]. Согласно современ-

For immunophenotypic analysis the cultured cells were stained with monoclonal antibodies CD29-PE, CD-45PE, CD-05-FITC (Serotec, UK), CD34 Class II-FITC, CD38-RPE (Dako, Holland), CD44-FITC, CD73-PE (BD Biosciences, USA) according to the manufacturing instructions. Cells were washed-out twice by centrifugation at 200g for 10 min in Hanks solution and analyzed using flow cytometer FACS Calibur (BD Biosciences, USA).

Differentiation potential of MSCs was examined *in vitro* when culturing in specific inductive media. To induce osteogenesis there was applied alpha-MEM medium, containing 10% FS; 0.1 mM dexamethazone; 0.05 mM ascorbic acid; 10 mM glycerol-phosphate. Adipogenesis was induced in alpha-MEM medium supplemented with 10% Adipogenic Stimulatory Supplements (Stem Cell Technologies Inc., Canada). The cells were cultured for 3 weeks, the medium was changed every 3 days.

Osteogenesis was revealed by the expression of alkaline phosphatase and presence of mineralization of extracellular matrix (von Kossa staining) [10]. Adipogenic differentiation of cells was assessed by Oil Red O staining of accumulated intracellular neutral lipids [10]. The cells cultured in growth medium with no special inducers served as the control.

Results and discussion

The obtained primary cultures of freshly isolated BM stromal cells were heterogenous on the composition and contained a slight amounts of adhesive hematopoietic cells, as well as macrophages, gradually eliminated during following culture. In primary culture of BM stromal cells the colony-forming units of fibroblasts (CFU_f) were revealed with the frequency of 1–2 per 100,000 plated nucleated cells [2]. According to the current notions this pool of stromal progenitor cells comprises multipotent MSCs [6]. During following sub-culture there was noted the formation of new colonies in the culture, testifying to the proliferation of early MSCs. After 3–4 passages the subcultures mainly consisted of predominantly spindle-shaped fibroblast-like cells with small oval nucleus, which proliferated and formed characteristic flows.

One of the main criteria of characterization of cell population is the investigation of the specific surface markers' expression. The studied human BM fibroblast-like cells, subcultured during 4 passages were characterized by immunophenotype of CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD105⁺ (Fig. 1).

Herewith the content of the cells expressed these markers in the studied cultures comprised more than 90%. Simultaneously they did not express the mark-

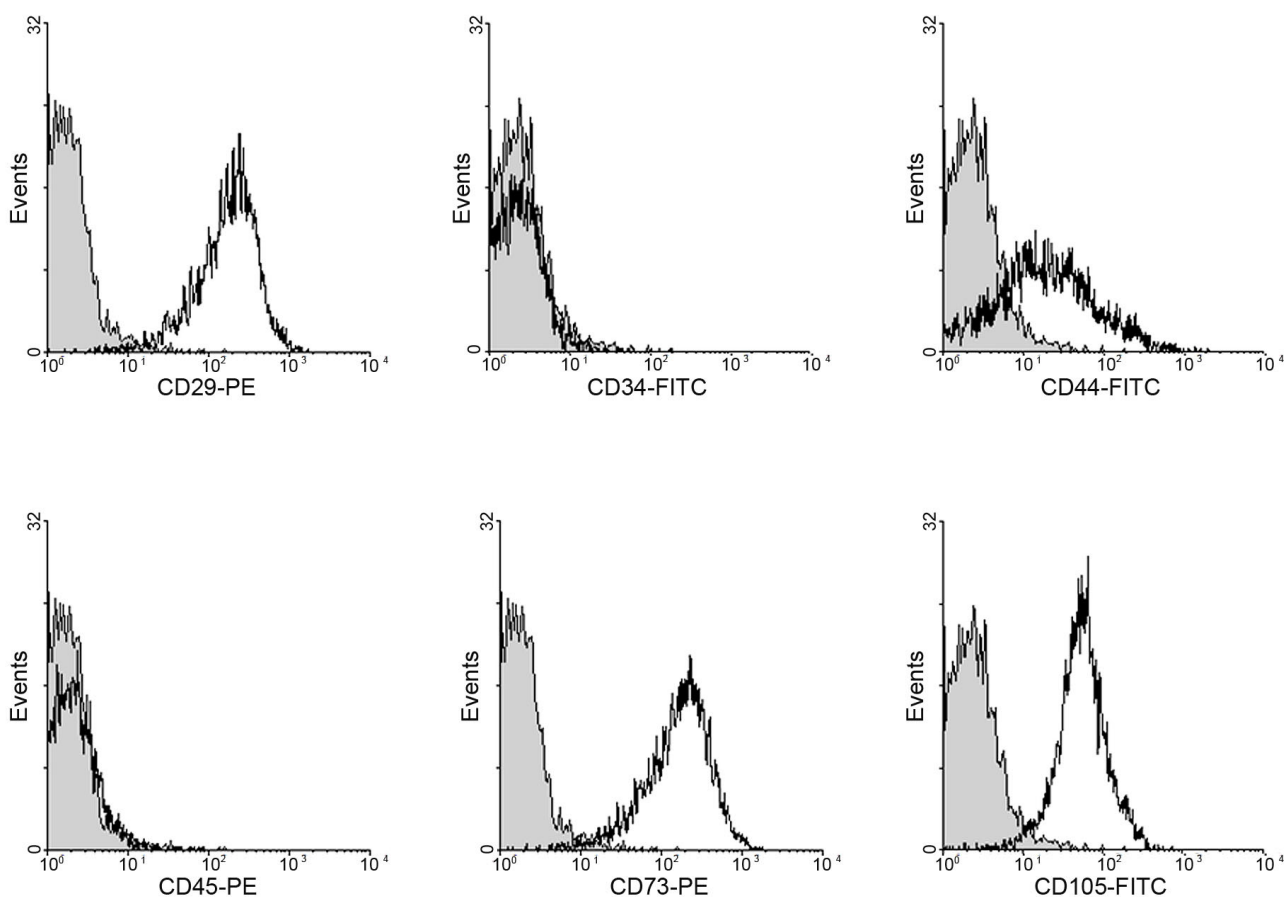


Рис. 1. Результаты проточной цитофлуориметрии культуры МСК КМ взрослого человека (4-й пассаж).

Fig. 1. Results of flow cytometry analysis of human adult BM MSCs culture (the 4th passage).

ным представлениям данный пул стромальных клеток-предшественников включает мультипотентные МСК [6]. При последующем пересеве было отмечено формирование новых колоний в культуре, что свидетельствовало о пролиферации ранних МСК. После 3–4-х пассажей субкультуры состояли преимущественно из веретенообразных фибробластоподобных клеток с небольшим овальным ядром, которые пролиферировали и формировали характерные потоки.

Одним из основных критериев состава клеточной популяции является экспрессия специфических поверхностных маркеров. Исследованные фибробластоподобные клетки КМ человека, субкультивированные в ходе 4-х пассажей, характеризовались иммунофенотипом CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD105⁺ (рис. 1).

При этом содержание клеток, экспрессирующих данные маркеры, в исследуемой культуре составляло более 90%. Одновременно они не экспрессировали маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD34, а также общий маркер гемопоэтических клеток CD45 (рис. 1). Представленный иммунофенотип характерен для МСК [7]. Следует

ers of hematopoietic stem cells CD34, as well as common marker of hematopoietic cells CD45 (Fig. 1). The presented immunophenotype has been shown for MSCs [7]. It should be noted that the similar immunophenotype was assessed for MSCs, derived from adult human derma and adipose tissue [1].

During culturing of MSCs in the medium, that stimulate cell differentiation in adipose lineage, the change in cells morphology after 7–10 days was observed: the cells gained roundish (oval) shape. Further culturing resulted in the accumulation of intracellular lipids, positively stained with Oil Red O. During stimulation of BM MSCs to the differentiation into osteogenic lineage the expression of alkaline phosphatase by cells as well as matrix mineralization, positively stained with silver nitrate by von Kossa (non-presented data) were observed.

After cryopreservation, thawing and removal of cryoprotectants no significant loss of cells was found, the survival of cells in suspension was not less than 65%. During the culture, cryopreserved cells adhered to plastic and proliferated. It has been noted that MSCs directly after cryopreservation formed subconfluent monolayer in average 3 days later if compared

отметить, что аналогичный иммунофенотип был установлен и для МСК, источником которых являлись дерма и жировая ткань взрослого человека [1].

При переводе МСК в среду культивирования, стимулирующую дифференцировку клеток в адипогенном направлении, наблюдалось изменение их морфологии через 7–10 суток культивирования, клетки приобретали округлую (овальную) форму. Дальнейшее культивирование приводило к накоплению внутриклеточных липидов, которые позитивно окрашивались масляным красным (Oil Red O). При стимуляции МСК КМ к дифференцировке в остеогенном направлении наблюдались экспрессия клетками щелочной фосфатазы, а также минерализация матрикса, позитивно окрашивающегося нитратом серебра по Ван Коссу (данные не представлены).

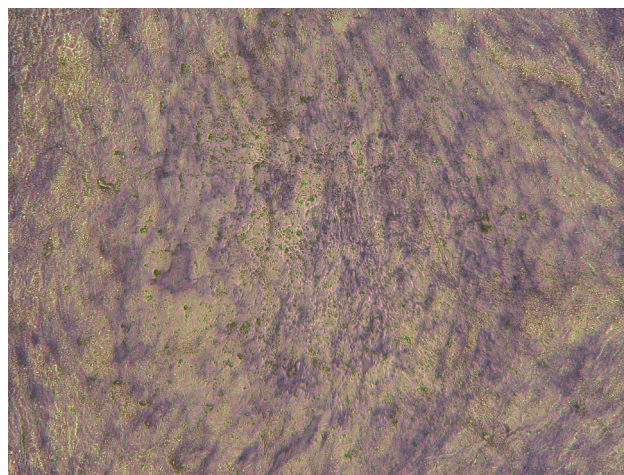
После криоконсервирования, отогрева и удаления криопротектора существенной потери клеток выявлено не было, сохранность суспензии составляла не менее 65%. При переносе в культуру криоконсервированные клетки адгезировали к пластику и пролиферировали. Отмечено, что МСК непосредственно после криоконсервирования формировали субконфлуентный монослой в среднем на 3-е суток позднее по сравнению с контролем (некриоконсервированными клетками), что, вероятно, связано с периодом репаративных процессов в клетках. В ходе дальнейшего субкультивирования в стандартных условиях криоконсервированные клетки активно пролиферировали и не отличались от некриоконсервированных.

Исследование иммунофенотипа МСК КМ человека после криоконсервирования показало, что он не отличался от такового до криоконсервирования. Более 90% клеток экспрессировали CD29, CD44, CD73, CD105 и оставались негативными на CD45 и CD34.

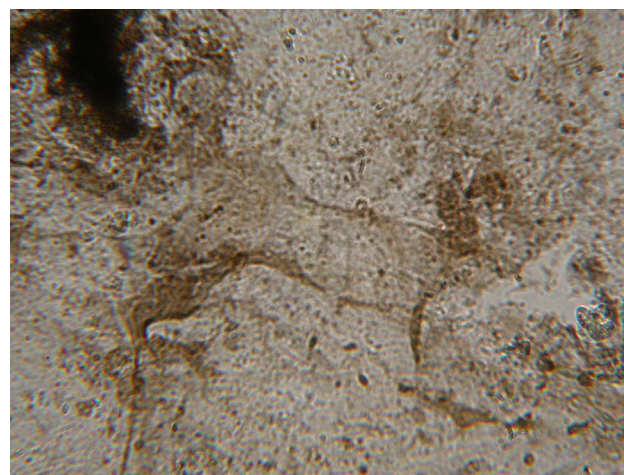
Изучение в условиях *in vitro* дифференцировочного потенциала культивированных МСК КМ показало, что криоконсервирование не влияло на способность исследуемых клеток к направленным остео- и адипогенной дифференцировкам. Экспрессия клетками щелочной фосфатазы, а также минерализация матрикса в остеогенной культуре свидетельствовали о функциональной активности дифференцировавшихся остеобластов (рис. 2).

В адипогенной культуре выявлены клетки, содержащие вакуоли с нейтральными жирами, что указывало на дифференцировку криоконсервированных МСК в адипогенном направлении (рис. 3).

Таким образом, выделение и последующая экспансия стромальных клеток из первичной суспензии КМ в условиях монослойного культивирования



а



б

Рис. 2. Дифференцировка МСК КМ в остеогенном направлении после криоконсервирования: а – экспрессия клетками щелочной фосфатазы; б – окрашивание минерализованного матрикса нитратом серебра по Ван Коссу, $\times 100$.

Fig. 2. Differentiation of BM MSCs into osteogenic lineage after cryopreservation: a – expression by the cells of alkaline phosphatase; b – staining of mineralized matrix with silver nitrate according to von Kossa, $\times 100$.

with the control (non-cryopreserved cells), which is likely related to the period of reparative processes in cells. During further sub-culturing under standard conditions the cryopreserved cells actively proliferated and did not differ from non-cryopreserved ones. The study of immune phenotype of human BM MSCs after cryopreservation has shown that it did not differ from that prior to cryopreservation. More than 90% cells expressed CD29, CD44, CD77, CD105 and remained negative on CD45 and CD34.

Investigation of differentiation potential of cultured BM MSCs *in vitro* demonstrated that cryopreservation did not affect the ability of the studied cells to directed osteo- and adipogenic differentiation. The alkaline phosphatase expression as well as matrix

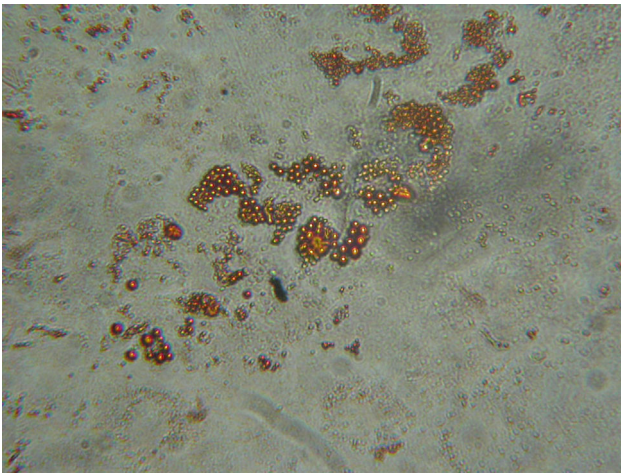


Рис. 3. Дифференцировка МСК КМ в адипогенном направлении после криоконсервирования (окрашивание Oil Red O), $\times 100$.

Fig. 3. Differentiation of BM MSCs in adipogenic lineage after cryopreservation (Oil Red O staining), $\times 100$.

позволили получить практически однородные культуры, обогащенные клетками с иммунофенотипом и дифференцировочным потенциалом, характерными для МСК. Процесс криоконсервирования с использованием 10% ДМСО, медленного двухступенчатого замораживания и быстрого отогрева позволяет в значительной степени сохранить количество МСК КМ с характерным иммунофенотипом и способностью к индуцированной дифференцировке в остео- и адипогенном направлениях. Следует отметить, что специфические свойства криоконсервированных МСК КМ оставались стабильными в ходе последующей экспансии.

Выводы

1. Стромальные клетки, изолированные из костного мозга взрослого человека, после экспансии *in vitro* демонстрируют специфический иммунофенотип и способность к мультилинейной дифференцировке, свойственные МСК.

2. Криоконсервирование МСК КМ человека путем медленного двухступенчатого замораживания под защитой 10% ДМСО позволяет сохранить их иммунофенотип и способность к индуцированным *in vitro* остео- и адипогенной дифференцировкам.

Литература

1. Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г. и др. Стромальные клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии проявляют иммунофенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток // Трансплантология.– 2008.– Т. 10, №1.– С. 84–86.
2. Скоробогатова Н.Г., Петренко Ю.А., Волкова Н.А., Петренко А.Ю. Изучение способности к дифферен-

цировки в остеогенной культуре, подтвержденной функциональной активностью дифференцированных остеобластов (Fig. 2).

В адипогенной культуре клетки содержали вакуоли с нейтральными липидами, указывая на дифференцировку криоконсервированных МСК в адипогенную линию (Fig. 3). Таким образом, изоляция и последующая экспансия стромальных клеток из первичной взвеси КМ в условиях культуры в монослое позволила получить культуры, обогащенные клетками с иммунофенотипом и дифференцировочным потенциалом, свойственным МСК. Криоконсервирование с использованием 10% ДМСО, медленного двухступенчатого замораживания и быстрого отогрева позволяет в значительной степени сохранить количество МСК КМ с характерным иммунофенотипом и способностью к индуцированной дифференцировке в остео- и адипогенном направлениях. Следует отметить, что специфические свойства криоконсервированных МСК КМ оставались стабильными в ходе последующей экспансии.

Conclusions

1. Stromal cells isolated from adult human bone marrow after *in vitro* expansion demonstrate the specific immunophenotype and ability to multi-lineage differentiation, typical to MSCs.

2. Cryopreservation of human BM MSCs by the application of slow two-step freezing under protection of 10% DMSO enables the preservation of their immunophenotype and ability to the induced *in vitro* osteo- and adipogenic differentiation.

References

1. Petrenko A.Yu., Petrenko Yu.A., Skorobogatova N.G. et al. Stromal cells of bone marrow, adipose tissue and human skin during expansion manifest immune phenotype and differentiation potential of mesenchymal stem cells // Transplantologiya.– 2008.– Vol. 10, N1.– P. 84–86.
2. Skorobogatova N.G., Petrenko Yu.A., Volkova N.A., Petrenko A. Yu. Study of ability to differentiation into osteogenic and adipogenic lineages of human bone marrow mesenchymal stromal cells of clonal origin // Biotechnology.– 2010.– Vol.3, N3.– P. 72–77.
3. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // Stem Cells.– 2001.– Vol. 19, N3.– P. 180–192.
4. Bosch P., Musgrave D.S., Lee J.Y. et al. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle // J. Orthop. Res.– 2000.– Vol. 18, N6.– P. 933–944.
5. 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.
6. Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses // Exp. Hematol.– 2000.– Vol. 28, N8.– P. 875–884.
7. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy.– 2006.– Vol. 8, N4.– P. 315–317.

- цировке в остеогенном и адипогенном направлениях мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека клонального происхождения // Биотехнология.– 2010.– Т. 3, №3.– С. 72–77.
3. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // Stem Cells.– 2001.– Vol. 19, N3.– P. 180–192.
 4. Bosch P., Musgrave D.S., Lee J.Y. et al. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle // J. Orthop. Res.– 2000.– Vol. 18, N6.– P. 933–944.
 5. 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.
 6. Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses // Exp. Hematol.– 2000.– Vol. 28, N8.– P. 875–884.
 7. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy.– 2006.– Vol. 8, N4.– P. 315–317.
 8. *Histological and histochemical methods. Theory and practice. Second edition / Ed. by J.A. Kilrnan.– Oxford: Pergamon Press, 1990.– 433 p.*
 9. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering // Arthritis Res. Ther.– 2003.– Vol. 5, N1.– P. 32–45.
 10. Xiang Ying, Zheng Qiang, Jia Bing-bing et al. Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells // J. Zhejiang Univ. Sci. B.– 2007.– Vol. 8, N2.– P. 136–146.
8. *Histological and histochemical methods. Theory and practice. Second edition / Ed. by J.A. Kilrnan.– Oxford: Pergamon Press, 1990.– 433 p.*
 9. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering // Arthritis Res. Ther.– 2003.– Vol. 5, N1.– P. 32–45.
 10. Xiang Ying, Zheng Qiang, Jia Bing-bing et al. Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells // J. Zhejiang Univ. Sci. B.– 2007.– Vol. 8, N2.– P. 136–146.

Accepted in 02.08.2010

*Поступила 02.08.2010
Рецензент Т.Г. Дубрава*