

Зміни морфофункціональних характеристик мезенхімальних клітин матриксу пуповини під час пасажування[#]

UDC 576; 57.04; 602.9

O.O. MASLOVA^{1,2*}, N.S. SHUVALOVA^{1,3}, O.M. SUKHORADA¹, O.G. DERYABINA^{1,3}, M.V. MAKARENKO⁴**Changes in Morphofunctional Characteristics of Umbilical Cord Matrix Mesenchymal Cells During Passaging[#]**

Використання мезенхімальних (мультипотентних) стовбурових (стромальних) клітин (МСК) – один із методів сучасної регенеративної медицини. Основними джерелами МСК вважаються кістковий мозок, жирова та неонатальні тканини (плацента, пуповина тощо) [1, 3]. Матрикс пуповини містить похідні поза-ембріональної мезенхіми, що поєднують властивості дорослих та ембріональних стовбурових клітин [7]. Згідно з останніми дослідженнями МСК необернено змінюються протягом пасажування [9]. Але немає єдиної думки щодо кількості етапів, які не призводять до втрати МСК властивостей мультипотентності [6]. Одні автори вказують на наявність значних морфологічних змін клітин вже на етапі 2–3 пасажів [6], інші – на етапі 5–6 пасажів [4]. Аналіз одержаних даних підтверджує відсутність уніфікованих методів підтримання клітин у мультипотентному стані та ставить під сумнів достатність традиційних критеріїв оцінки характеристик цього типу клітин.

Метою даного повідомлення є демонстрація морфологічних змін, що супроводжують культивовані клітини матриксу пуповини людини. У рамках масштабної роботи, головною задачею якої було отримання культури клітин матриксу пуповини, що відповідали б описаним характеристикам МСК, було відмічено деякі тенденції змін культури у процесі пасажування.

Базуючись на даних, отриманих протягом трьох років роботи з культурами МСК з матриксу пуповини, ми припускаємо, що розбіжності у стані клітин на різних пасажах можуть бути пов'язані з індивідуальними характеристиками донорів клітин.

The application of mesenchymal (multipotent) stem (stromal) cells (MSCs) is one of the methods in current regenerative medicine. The main sources of MSCs are bone marrow, adipose and neonatal (placenta, umbilical cord *etc.*) tissues [1, 3]. Matrix of umbilical cord contains derivatives of post-embryonic mesenchyma combining peculiarities of mature and embryonic stem cells [7]. According to the recent investigations the MSCs are irreversibly changed during passaging [9]. However, there is no generally accepted point of view on the number of steps, which do not result in the loss of multipotency by MSCs [6]. Some authors report the presence of significant morphophysiological changes of cells at the stage of 2–3 passages [6], others do at the stage of 5–6 passages [4]. Analysis of the obtained data confirms the absence of the unified methods of cell maintenance in multipotent state and puts in doubt the sufficiency of traditional criteria for assessment of characteristics of this type of cells.

The research aim was to reveal the morphological changes, accompanying cultured cells of matrix of human umbilical cord. Within frames of wide research a main task was derivation of cell culture of umbilical cord matrix that would be corresponded to the described characteristics of MSCs there were revealed some changes of cultures during passaging.

Based on the data obtained during 3 years of the research in cultures of MSCs from umbilical cord matrix we suppose that differences in cell state at various passages may be associated with individual characteristics of donor cells.

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини» НАМН України, м. Київ

²ННЦ «Інститут біології» КНУ імені Тараса Шевченка, м. Київ

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

⁴Міський пологовий будинок №5, просп. Червонозоряний, 2, м. Київ

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Вишгородська, 67; Київ, Україна 04114; електронна пошта: rotiferko@gmail.com

[#]Дослідження було представлено на міні-симпозіумі «День стовбурової клітини», що відбувся 22 травня 2012 року в місті Харкові.

¹Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Institute of Biology at the Taras Shevchenko National University, Kiev, Ukraine

³Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁴Kiev Maternity Clinic N5

* To whom correspondence should be addressed: 67, Vyshgorodska str., Kyiv, Ukraine 04414; e-mail: rotiferko@gmail.com

[#] This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22nd of May, 2012.

Проаналізовано більше 300 зразків пуповини. Клітини виділяли за комбінованою механічно-ензиматичною методикою (модифікованою за С.К. Tong [8]). Отримані мезенхімальні клітини культивувались у середовищі DMEM («PAA», Австрія) з низьким вмістом глюкози та додаванням антибіотиків (пеніцилін та стрептоміцин 1%) та антимікотику (амфотеріцин В 0,1%), 10% ембріональної телячої сироватки («PAA»), 2 мМ L-глутаміну та 10 нМ FGF («Інтерфарм Біотек», Україна). Культивування проводилось у CO₂-інкубаторі (37°C, 5% CO₂). Використовували культуральні флакони («PAA») 75 та 25 см². Клітини пересівали за допомогою суміші трипсин-версен при досягненні культурую 70% конфлюентності. Клітини висівали із розрахунку 10⁴ на см². Для оцінки стану культур використовували інвертований мікроскоп «Leica DMIL» (Німеччина) та фотоапарат «Canon PowerShot 640A» (Японія). FACS-аналіз експресії маркерів МСК (CD105, CD90, CD73 – «BD», США) виконано на сортері «BD FACSAria» із застосуванням програмного забезпечення «BD FACSDiva» у відділі клітинних та тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України В.М. Кириком. Статистичну обробку результатів проводили у «MS Excel» та програмі для статистичної обробки «x7 2009».

В результаті проведених досліджень отримано наступне. З експериментів були виключені 10% зразків на етапі 0–2 пасажів у зв'язку з грибовою або бактеріальною контамінацією. З 15% зразків пуповин не вдалось отримати культуру клітин без виявлення конкретної причини. З 75% пуповин було отримано клітини фібробластоподібної форми довжиною 20–100 мкм (рис. 1), які при підвищенні конфлюентності культури схильні до подовження, стоншення та набуття щільного моношару. У більшій частині проаналізованих зразків культур достатньо гомогенними за морфологічними ознаками були 1-й та 2-й пасажі. Зазвичай 0-й пасаж є досить гетерогенним та контамінованим еритроцитами, які повністю елімінуються лише після 3–4 змін середовища. У деяких зразках з 3-го пасажу у культурі починають з'являтися поодинокі клітини атипової форми. З подальшим пасажуванням у культурі накопичуються старіючі та гігантські клітини. Вони вирізняються округлою або полігональною формою, гетерогенною цитоплазмою, появою прозорих або темних вакуолей (рис. 2). Встановлено, що найбільш однорідними є 1-й та 2-й пасажі, проте велика кількість проаналізованих культур дозволила спостерігати відмінності у станах культур, отриманих з різних зразків, на одних і тих самих пасажах. У 25% спостерігалась рання деградація культури: поява атипових клітин та зниження швидкості проліферації

More than 300 samples of umbilical cord were analyzed. The cells were isolated by combined mechanic-enzymatic method (modified according C.K. Tong [8]). The obtained mesenchymal cells were cultured in DMEM (PAA, Austria) with low content of glucose and supplemented with antibiotics (penicillin and 1% streptomycin) and antimycotic agent (0.1% amphoterycin B), 10% fetal bovine serum (PAA), 2 mM of L-glutamine and 10 nM FGF (Interfarm Biotec). The culturing was performed in CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂). Culture flasks (PAA) of 75 and 25 cm² were used. The cells were passaged using trypsin and Versen's solutions mixture when culture achieved 70% confluence. The cells were inoculated in the amount of 10⁴ per cm². To assess the state of culture we used the inverted microscope Leica DMIL (Germany) and Canon PowerShot 640A (Japan). FACS-analysis of MSC markers expression (CD105, CD90, CD73 – BD, USA) was performed with BD FACSAria cell sorter and BD FACSDiva software at the Department of Cell and Tissue Technologies of the Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine by V.M. Kyryk. Statistical processing of the results was performed with Excel and x7 ver. 2009 software.

The performed investigations gave the following results. At the stage of 0–2 passages 10% of samples were excluded from the experiments due to fungal and bacterial combination. We did not manage to obtain the cell culture from 15% of the samples for unclear reasons. From 75% of umbilical cords we have obtained the cells of fibroblast-like shape with 20–100 μm length (Fig. 1), which were inclined to elongation, thinning and forming dense monolayer when reaching confluent culture. In the bulk of the studied culture samples the 1st and the

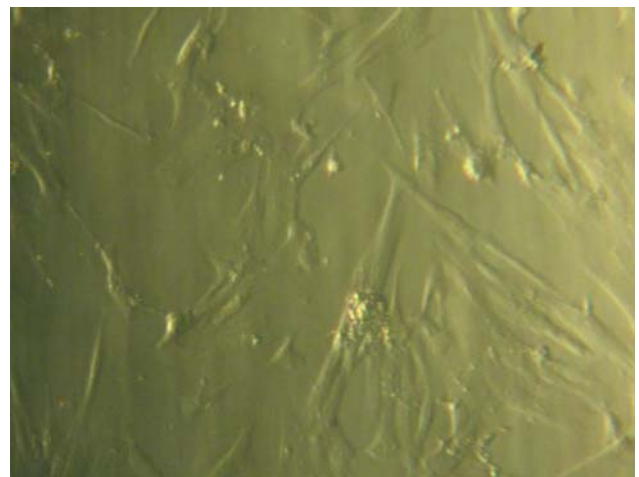


Рис. 1. Жива незабарвлена культура МСК, 1-й пасаж, ×100.
Fig. 1. Viable non-stained culture of MSCs, the 1st passage, ×100.

(інколи вже на 1-му пасажі), а у 50% – культура зберігала фібробластоподібну морфологію до 3–6-го пасажу. Це спостереження є доказом неоднорідності зразків пуповини як матеріалу для отримання МСК.

Експресія типових позитивних маркерів (CD105, CD90, CD73) – одна з основних характеристик МСК [5]. Згідно з нашими даними експресія поверхневих маркерів мезенхімальними клітинами матриксу пуповини має тенденцію змінюватись у пасажах і сягати найменших середніх значень на етапі 6-го пасажу. Середню кількість клітин у популяції (у відсотках), що експресують типові маркери, показано на рис. 3. Спостерігається тенденція до зниження інтенсивності експресії маркерів CD105 та CD90 від 1 до 6-го пасажів, проте ці зміни не є статистично достовірними ($p > 0,05$) через наявність значних відмінностей у експресії в межах одного пасажу. Популяція клітин 0-го пасажу є найбільш гетерогенною за ступенем експресії CD90 (min 8%, max 97,8%), а популяція клітин 3-го пасажу – за ступенем експресії CD105 (min 5,5%, max 75%). Це може вказувати на індивідуальні відмінності між зразками пуповини. Найбільшою стабільністю експресії володіє маркер CD73 (від min 70,1% на 6-му пасажі до max 99,3% на 1-му пасажі) – його експресія найменше змінюється

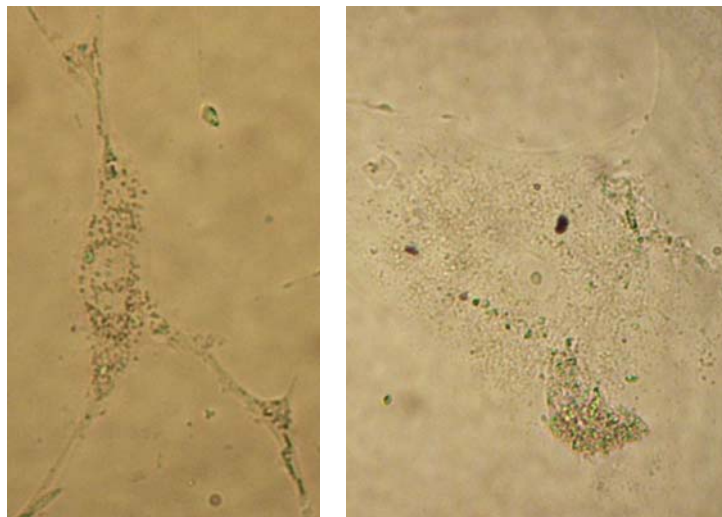


Рис. 2. Атипівні клітини у культурі МСК на 2–3-му пасажах. Живі, незабарвлені, $\times 200$.

Fig. 2. Atypical cells in MSC culture in the 2nd and the 3rd passages. Vital non-stained cells, $\times 200$.

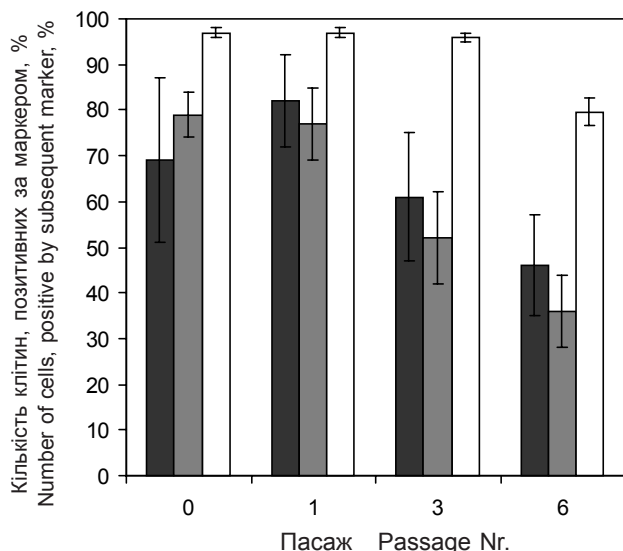


Рис. 3. Тенденції змін експресії позитивних поверхневих маркерів МСК у пасажах (показано середні значення та стандартна помилка середнього): ■ – CD90; ■ – CD105; □ – CD73.

Fig. 3. Trends of changes in the expression of MSCs positive surface markers in passages (mean values and standard mean error are presented): ■ – CD90; ■ – CD105; □ – CD73.

2nd passages were rather homogenous by morphological characteristics. Usually culture of passage 0 was rather heterogenic and contaminated by erythrocytes which were entirely eliminated only after 3–4 changes of the medium. In some samples we observed single cells of atypical shape starting to appear from the 3rd passage. Further passaging was accompanied with accumulation of the senescent and giant cells in the culture. They were distinguished by rounded and polygonal shape, heterogenic cytoplasm, appearance of clear and dark vacuoles (Fig. 2). It was established that the most homogenous were the 1st and the 2nd passages, but a great number of analyzed cultures enabled to observe the differences in state of cultures obtained from different samples at the same passages. In 25% of samples we noted early culture degradation: appearance of atypical cells and decrease in proliferation rate (sometimes even at the 1st passage), in 50% the culture preserved fibroblast-like morphology till the 3rd through the 6th passage. This investigation is the evidence for non-homogeneity of umbilical cord samples as the material for obtaining MSCs.

Positive expression of typical markers (CD105, CD90, CD73) is one of the main characteristics of MSCs [5]. According to our data the expression of surface markers by mesenchymal cells of umbilical cord matrix had a tendency to change through passages and reached the minimal average values at the 6th passage. An average number of cells in population (in percents) expressed the typical markers is shown in Fig. 3. We observed the tendency to the lowering of expression intensity for CD105 and CD90 markers from the 1st to the 6th passages but these changes were not statistically significant ($p > 0.05$) due to the presence of essential differences in ex-

ся під час пасажування, а у межах одного пасажу розкид значень є найменшим. Варто зазначити, що культури, які характеризувались більшою гомогенністю та вираженою фібробластоподібною формою клітин, демонстрували й вищі показники експресії позитивних поверхневих маркерів.

Отже, можна припустити, що відмінності у властивостях культур, що вирощувались у стандартних умовах, можуть бути пов'язані з індивідуальними особливостями кожного зі зразків пуповини, що можуть відрізнятися у залежності від стану здоров'я новонародженого та матері, а також від впливу різних хімічних речовин (у тому числі ліків) протягом вагітності та пологів. Отримані дані можуть бути потенційно корисними при розробці та оптимізації способів кріоконсервування мезенхімальних клітин матриксу пуповини.

Література

1. Augello A., Kurth TB., De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niche. // *Eur. Cell Mater.* – 2010. – Vol. 20. – P. 121–133.
2. Bieback K., Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy // *World J. Stem Cells.* – 2010. – Vol. 2, №4. – P. 81–92.
3. Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J., Cetrulo C.L. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications // *Placenta.* – 2011. – Vol. 32, Suppl. 4. – P. S311–315.
4. Wagner W., Horn P., Castoldi M. et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process // *PLoS ONE.* – 2008. – Vol. 3, №5. –P. e2213.
5. Osipova E.Y., Shamanskaya T.V., Kurakina O.A. et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells during ex vivo expansion // *Br. J. Med. Med. Res.* – 2011. – Vol. 1, №3. – P. 85–95.
6. Angelucci S., Marchisio M., Di Giuseppe F. et al. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion // *Proteome Science.* – 2010. – Vol. 8: 18.
7. Chong P., Selvaratnam L., Abbas A., Kamarul T. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells // *J. Orthop. Res.* – 2011. – Vol. 30, №4. – P. 634–642.
8. Tong C.K., Vellamy S., Tan B.C. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method // *Cell Biol. Int.* – 2011. – Vol. 35, №3. – P. 221–226 .
9. 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 // *Cytherapy.* – 2006. – Vol. 8, №4. – P. 315–317.

Поступила 01.06.2012

pression within one passage. Cell population of passage 0 was the most heterogenic by expression level of CD90 (min 8%, max 97.8%) and cell population of the 3rd passage was the most heterogenic by expression level of CD105 (min 5.5%, max 75%). This may point to individual differences between umbilical cord samples. Marker CD73 had the most stable expression (from min 70.1% at the 6th passage up to max 99.3% in the 1st passage) and within one passage the range of values is the least. It should be mentioned that the cultures characterized by the highest homogeneity and expressed fibroblast-like shape of cells demonstrated also higher expression indices of positive surface markers.

Thus it could be supposed that the differences in properties of the cultures grown in standard conditions may be associated with individual peculiarities of each umbilical cord sample. These samples may differ depending on the health state of mother and newborn as well as the influence of different chemical substances (including drugs) during pregnancy and labor. The obtained data may be potentially useful to develop and optimize the ways of cryopreservation of mesenchymal cells from umbilical cord matrix.

References

1. Augello A., Kurth TB., De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niche. // *Eur. Cell Mater.* – 2010. – Vol. 20. – P. 121–133.
2. Bieback K., Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. // *World J. Stem Cells.* – 2010. – Vol. 2, N4. – P. 81–92.
3. Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J., Cetrulo C.L. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications // *Placenta.* – 2011. – Vol. 32, Suppl. 4. – P. S311–315.
4. Wagner W., Horn P., Castoldi M. et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process // *PLoS ONE.* – 2008. – Vol. 3, N5. –P. e2213.
5. Osipova E.Y., Shamanskaya T.V., Kurakina O.A. et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells during ex vivo expansion // *Br. J. Med. Med. Res.* – 2011. – Vol. 1, N3. – P. 85–95.
6. Angelucci S., Marchisio M., Di Giuseppe F. et al. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion // *Proteome Science.* – 2010. – Vol. 8: 18.
7. Chong P., Selvaratnam L., Abbas A., Kamarul T. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells // *J. Orthop. Res.* – 2011. – Vol. 30, N4. – P. 634–642.
8. Tong C.K., Vellamy S., Tan B.C. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method // *Cell Biol. Int.* – 2011. – Vol. 35, N3. – P. 221–226 .
9. 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 // *Cytherapy.* – 2006. – Vol. 8, N4. – P. 315–317.

Accepted 01.06.2012