

Методы оценки адипогенной и остеогенной дифференцировки криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток

Ю.А. ПОВЕРЕННАЯ, Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Assessment Methods of Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells

YU.A. POVERENNA, YU.A. PETRENKO

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

Основной показатель функциональной активности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) до и после криоконсервирования – их способность к направленной дифференцировке *in vitro*. При этом важно выбрать наиболее информативные и удобные методы оценки полноты дифференцировки.

Цель работы – провести сравнительное исследование методов оценки адипогенной и остеогенной дифференцировки МСК, а также выбрать наиболее удобные и демонстративные методы, позволяющие оценить степень и полноту дифференцировки клеток при культивировании в различных условиях.

МСК жировой ткани взрослого человека выделяли и культивировали, как описали Петренко А.Ю. и соавт., 2008. Криоконсервирование клеток проводили под защитой 10% ДМСО со скоростью 1°C/мин до –80°C с последующим погружением образцов в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане при 37°C, после чего оценивали дифференцировочные свойства клеток при культивировании в среде, содержащей специфические факторы остеогенной и адипогенной дифференцировки. Эффективность адипогенной дифференцировки МСК оценивали с использованием гистохимического окрашивания Oil Red O и нильским красным. В дальнейшем проводили экстракцию Oil Red O и определяли его внутриклеточное содержание спектрофотометрически. Кроме того, накопление внутриклеточных нейтральных липидов оценивали по количеству экстрагированных триацилглицеридов. Активность и количество щелочной фосфатазы в МСК после проведения остеогенной дифференцировки оценивали гистохимически по окрашиванию Fast Blue Naphtol RR Salts (Sigma, США), а также по ее внутриклеточному содержанию после экстракции с использованием биохимического набора ALP 120 (Lachema, Чехия). Накопление минерализованного матрикса оценивали с использованием набора Ca 250 (Lachema, Чехия). Все показатели были отнесены к количеству ДНК в исследованных образцах.

Установлено, что окрашивание дифференцированных клеток Oil Red O и Fast Blue, а также последующая экстракция окрашенного внутриклеточного продукта является простым и информативным методом оценки адипогенной и остеогенной дифференцировки, однако не позволяет исследовать эффективность дифференцировки МСК в составе более сложных трехмерных систем. Вместе с тем использование биохимических методов количественного определения специфического для дифференцированных клеток продукта позволяет универсально оценивать полноту дифференцировки МСК в различных системах.

The main parameter of mesenchymal stromal cells (MSCs) functional activity before and after cryopreservation is the capacity of cells for induced differentiation *in vitro*. In this case the important point is to choose the most informative and easy to use methods of differentiation efficiency assessment.

The aim of this study was to prepare the comparative analysis of assessment methods of MSC adipogenic and osteogenic differentiation, as well as to choose the most reliable and demonstrative methods, that allow to assess the completeness of cell differentiation during culture in different conditions.

Human adult adipose tissue MSC were isolated and cultured as described recently (Petrenko A. Yu. *et al.*, 2008). Cryopreservation of cells was carried out under protection of 10% Me₂SO with the cooling rate of 1°C per min down to –80°C, with following plunging into liquid nitrogen. Thawing was performed on the water bath at 37°C and cells were differentiated into adipogenic and osteogenic lineages, using media, supplemented with specific differentiation factors. The efficiency of adipogenic differentiation was assessed using histochemical staining with Oil Red O and Nile red. The intracellular content of Oil Red O was assessed by absorbance measurement of extracted Oil Red O product. Furthermore the accumulation of intracellular neutral lipids was determined by the quantity of extracted triacylglycerides. Activity or quantity of alkaline phosphatase in MSC after osteogenic differentiation was assessed using histochemical staining with Fast Blue Naphtol RR Salts (Sigma, USA), as well as by determination of its intracellular content after extraction using biochemical kit ALP120 (Lachema, Czech Republic). The accumulation of mineralized matrix was assessed with the Ca 250 assay kit (Lachema, Czech Republic). All mentioned parameters were normalized to DNA content in investigated samples.

It was established that the staining of differentiated cells with Oil Red O and Fast Blue and following extraction of stained intracellular products could be applied as informative methods of assessment of adipogenic and osteogenic differentiation, however these methods could not be used for the investigation of the MSC differentiation efficiency within more complicated three-dimensional systems. At the same time, the application of biochemical methods for quantitative determination of differentiated cell specific products allows to assess the completeness of MSC differentiation in different systems.