

Дослідження морфофункціональних характеристик кріоконсервованих культур клітин стромального походження

UDC 611.018.46.085.23:615.014.41

N.O. VOLKOVA

Study of Morphological Characteristics of Cryopreserved Cell Cultures of Stromal Origin

Проведено кріоконсервування мезенхімальних стромальних клітин (МСК) кісткового мозку та культури клітин хоріона (ККХ) під захистом 10% ДМСО та 20% ембріональної сироватки з застосуванням низької швидкості охолодження (1 град/хв) до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот. Отримані результати показали, що після низькотемпературного зберігання обидві досліджені культури зберігали здатність до проліферації та спрямованого диференціювання. Культура клітин хоріона характеризувалася більш високою проліферативною активністю порівняно із МСК кісткового мозку. Здатність до спрямованого диференціювання в адипо- та хондрогенному напрямках була вищою у МСК кісткового мозку, ніж у ККХ.

Ключові слова: кріоконсервування, культури клітин, проліферація, диференціювання.

Проведено кріоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга и культуры клеток хориона (ККХ) под защитой 10% ДМСО и 20% эмбриональной сыворотки с использованием низкой скорости охлаждения (1 град/мин) до -80°C с последующим погружением в жидкий азот. Полученные результаты показали, что после низкотемпературного хранения обе исследуемые культуры сохраняли способность к пролиферации и направленному дифференцированию. Культура клеток хориона характеризовалась более высокой пролиферативной активностью относительно МСК костного мозга. Способность к направленному дифференцированию в адипо- и хондрогенном направлениях была выше у МСК костного мозга, чем у ККХ.

Ключевые слова: кріоконсервирование, культуры клеток, пролиферация, дифференцирование.

Mesenchymal stromal cells (MSCs) of bone marrow and chorion cell culture (CCC) were cryopreserved under protection of 10% DMSO and 20% fetal bovine serum using low cooling rate (1 deg/min) down to -80°C with following plunging into liquid nitrogen. The findings have shown that after low temperature storage both studied cultures kept the ability to proliferation and directed differentiation. Chorion cell culture was characterized with higher proliferative activity if compared with bone marrow MSCs. The ability to the directed differentiation towards adipo- and chondrogenic lineages was higher for bone marrow MSCs versus CCC.

Key words: cryopreservation, cell culture, proliferation, differentiation.

На сьогодні широко використовують як модельний об'єкт для потреб біомедичних технологій культивовані мезенхімальні стромальні клітини (МСК), джерелами яких є кістковий мозок, жир, плацента, амніон, кордова кров та ін. [5, 10, 14, 15]. Це обумовлено високим проліферативним потенціалом, здатністю до спрямованого диференціювання та наявністю специфічного імунофенотипу. Мезенхімальні стромальні клітини, які отримані з тканин фетоплацентарного комплексу та тканин дорослого організму, мають схожі морфологічні та фенотипічні характеристики [7, 8]. Культивовані клітини хоріона (ККХ), які виділені з тканини раннього хоріона є фібробластоподібними клітинами, що мають здатність до адгезії, проліферації та характеризуються вмістом 95% клітин з імунофенотипом $\text{CD}90^+\text{CD}73^+\text{CD}105^+$ [10, 15]. Для створення запасу МСК з метою їх подальшого застосування

Nowadays the cultured mesenchymal stromal cells (MSCs), the sources of those are bone marrow, fat, placenta, amnion, cord blood *etc.*, have been widely used as the model object for the demands of biomedical technologies [5, 10, 14, 15]. This is stipulated with a high proliferative potential, capability to the directed differentiation and presence of specific immune phenotype. Mesenchymal stromal cells derived from the tissues of fetoplacental complex and adult tissues have similar morphological and phenotypic characteristics [7, 8]. Chorion cultured cells (CCCs) isolated from a tissue of early chorion are fibroblast-like cells with the ability to adhesion, proliferation and characterized with the content of 95% of cells with immune phenotype $\text{CD}90^+\text{CD}73^+\text{CD}105^+$ [10, 15]. Low temperature preservation is necessary for establishing the stock of MSCs for their further use in regenerative medicine. In cryopreservation protocols of bone mar-

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*Адреса для кореспонденції: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: (+38 057) 373-31-19, факс: (+38 057) 373-30-84, електронна пошта: volkovanatali2006@yandex.ru

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: volkovanatali2006@yandex.ru

у регенераторній медицині необхідно низькотемпературне консервування. В протоколах кріоконсервування стромальних клітин кісткового мозку використовували повільне охолодження з наступним зберіганням при температурі -80°C або у рідкому азоті [4, 6, 9] з кріозахисним середовищем у вигляді суміші кріопротекторів ендо- і екзоцелюлярного типу. Безпосередньо після заморожування-відігріву культур МСК необхідним етапом є проведення їх ретельної оцінки за морфологічними параметрами, а саме життєздатності, здатності до адгезії, проліферації та спрямованого диференціювання. Дослідження впливу заморожування-відігріву на проліферацію та потенціал диференціювання МСК важливо як для розуміння механізмів процесів регуляції у клітин-попередників, так і для оптимізації протоколів кріоконсервування, які забезпечують збереження стовбурової фракції досліджених клітин. Цікаво, чи може протокол кріоконсервування, що успішно використовували для МСК кісткового мозку [4, 6, 9, 16], бути застосований для клітин з іншого джерела – хоріона. Однакові умови кріоконсервування дозволяють оцінити вплив низьких температур на збереження проліферативних характеристик і здатність до спрямованого диференціювання МСК, отриманих з різних джерел.

Метою роботи було порівняльне дослідження морфофункціональних властивостей кріоконсервованих культур клітин хоріона і МСК кісткового мозку.

Матеріали і методи

У роботі використовували культури клітин хоріона людини [2, 15] та МСК кісткового мозку щурів [5, 17]. При культивуванні обох культур щільність посіву клітин становила 10^3 клітин/ cm^2 культурального флакона площею 25 cm^2 («PAA», Австрія). Живильне середовище культивування містило: середовище IMDM («PAA»), 10% ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби («HyClone», США), гентаміцин (150 мкг/мл) («Фармак», Україна) та амфотеріцин Б (10 мкг/мл) («PAA»). Живильне середовище змінювали кожні 3 доби. У роботі були використані стандартні умови культивування при 37°C в атмосфері $5\% \text{ CO}_2$. Після утворення моношару культури клітин пасирували. Кріоконсервування обох культур здійснювали під захистом 10% ДМСО («PAA») з додаванням 20% ЕС на живильному середовищі. Отриману суспензію вмішували по 1 мл у кріопробірки («Nunc», США). Охолодження зразків проводили зі швидкістю 1 град/хв до -80°C у парах зрідженого азоту в умовах кріосховища протягом 30 хв з подальшим зануренням у рідкий азот [9]. Зразки зберігали в умовах низько-

row stromal cells slow cooling rates with following maintaining either at -80°C or liquid nitrogen have been successfully used [4, 6, 9] with cryoprotective medium as the mixture of cryoprotectants of exocellular type. Directly after freeze-thawing of MSCs cultures the necessary stage is a thorough assessment of morphological parameters, namely, viability, ability to adherence, proliferation and directed differentiation. Investigation of freeze-thawing effect on proliferation and potential of MSCs differentiation is important both for understanding the mechanisms of regulation processes in progenitor cells and for optimization of cryopreservation protocols, providing the preservation of the fraction of the studied cells. It would be of interest to check if the cryopreservation protocol successfully applied for bone marrow MSCs [4, 9, 16] could be used in the case of the cells from another source, the chorion. Similar cryopreservation conditions allow the estimation of the effect of low temperatures on preservation of proliferative characteristics and capability for directed differentiation of MSCs, derived from different sources.

The research aim was to comparatively study the morphofunctional properties of cryopreserved cultures of chorion cells and bone marrow MSCs.

Materials and methods

Investigations were performed in the cultures of human chorion [2, 15] and bone marrow MSCs of rats [5, 17]. When culturing both cultures the plating density of cells was 10^3 cells/ cm^2 of cultural flask with 25 cm^2 area (PAA, Austria), 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, USA), gentamicin ($150 \text{ }\mu\text{g/ml}$) (Farmak, Ukraine) and amphotericin B ($10 \text{ }\mu\text{g/ml}$) (PAA). Nutritive medium was changed every 3 days. In the research there were used the standard conditions of culturing at 37°C in $5\% \text{ CO}_2$ atmosphere. After monolayer formation the cell cultures were passaged. Both cultures were passaged under protection of 10% DMSO (PAA) and 20% FBS on the base of nutritive medium. The resulted suspension was placed by 1 ml into the cryovials (Nunc, USA). The samples were cooled with the rate of 1 deg/min down to -80°C in liquid nitrogen vapors in cryostorage conditions for 30 min with following plunging into liquid nitrogen [9]. The samples were stored under conditions of low temperature bank for 4 months, thawed on water bath at 40°C up to the appearance of liquid phase. Cryoprotectant was removed with adding surplus (1:9) volume of Hank's solution (PAA) with following centrifugation at 1,500 rot/min (834g) for 5 min. Cell membrane integrity was assessed with the test on exclusion of supravital dye trypan blue (Sigma, USA). The obtained suspension of cells

температурного банку протягом 4 місяців, відігрівали на водяній бані при 40°C до появи рідкої фази. Кріопротектор видаляли додаванням надлишкового (1:9) об'єму розчину Хенкса («РАА») з наступним центрифугуванням при 1500 об/хв (834g) протягом 5 хв. Цілісність мембрани клітин оцінювали за тестом на виключення суправітального барвника трипанового синього («Sigma», США). Отриману суспензію клітин ресуспендували в живильному середовищі і висівали на культуральні флакони. При культивуванні обох досліджуваних культур після кріоконсервування застосовували такі ж умови, як і для початкових культур.

Для визначення приросту кількості клітин у досліджених культурах на 3, 5, 7, 10, 14-у добу їх ферментативно (0,25% розчин трипсину:розчин Версену, «РАА») знімали з пластика та підраховували кількість клітин [1, 3]. Для спрямованого диференціювання досліджуваних культур в адіпо- та хондрогенному напрямках змінювали живильне середовище (на 15-у добу культивування) на середовище диференціювання. Адіпогенне середовище складалося з IMDM, 1% ЕС, 10^{-7} М дексаметазону, 10^{-9} М інсуліну; хондрогенне – IMDM, 10^{-5} аскорбат-2-фосфату, 10 нг/мл TGF- β («Sigma»). Всі складові, використані для диференціювання, були виробництва «РАА». Подальше культивування проводили протягом 3-х тижнів зі зміною середовища 2 рази на тиждень. Для підтвердження диференціювання *in vitro* в адіпогенному напрямку клітини фарбували Sudan IV («Fluka», Німеччина) (підраховували кількість клітин з ліпідними краплями, які мали оранжеве забарвлення, $n = 5$), хондрогенного – Toluidine blue (Fluka) (підраховували кількість клітин з наявністю протеогліканів в екстрацелюлярному матриці, які мали синє забарвлення, $n = 5$). Кількість диференційованих клітин підраховували у світловому мікроскопі та визначали їх відсоток до загальної кількості клітин. Контролем спонтанного диференціювання були клітини, культивовані у відсутності спеціальних індукторів.

При статистичній обробці результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз і t-критерій Стьюдента за допомогою програми Excel.

Результати та обговорення

Першим етапом роботи було дослідження цілісності мембрани клітин після кріоконсервування з використанням тесту на виключення трипанового синього. Після кріоконсервування життєздатність МСК кісткового мозку складала $78,5 \pm 6,2\%$, що у 1,2 рази нижче відповідного показника у початкових культурах ($95,2 \pm 4,5\%$). Показник життєздатності кріоконсервованих ККХ був знижений у 1,2 рази

was resuspended in nutritive medium and plated into cultural flasks. When culturing both studied cultures after cryopreservation there were used the same conditions as for initial cultures.

To examine the increment of cell number in the studied cultures to the 3, 5, 7, 10, 14 days they were enzymatically (0.25% trypsin solution: Versene solution, PAA) detached from plastic and the number of cells was counted [1, 3]. For the directed differentiation of the studied cultures towards adipo- and chondrogenic lineages the nutrient medium was changed to differentiation medium (to the 15th day of differentiation). Adipogenic medium comprised IMDM, 1 FBS, 10^{-7} M dexamethasone, 10^{-9} insulin; chondrogenic one did IMDM, 10^{-5} ascorbate-2-phosphate, 10 ng/ml TGF- β (Sigma). All the components used for differentiation were of PAA production. Following culturing was performed during 3 weeks with changing the medium twice a week. To confirm the differentiation *in vitro* towards adipogenic lineage the cells were stained with Sudan IV (Fluka, Germany) (the number of cells with lipid drops having an orange color, $n = 5$, was counted), chondrogenic one was done with Toluidine blue (Fluka) (there was counted the number of cells with the presence of proteoglycans in extracellular matrix, having blue colour, $n = 5$). The number of differentiated cells was counted with light microscope and their percentage to total number of cells was found. The controls of spontaneous differentiation were the cells cultured in the absence of special inducers.

Statistical processing of the results involved one-way ANOVA test and Student's t-criterion with the help of Excel software.

Results and discussion

The first step of the work was the studying of cell membrane integrity after cryopreservation using the test for the exclusion of trypan blue. After cryopreservation the viability of bone marrow MSCs made $78.5 \pm 6.2\%$ which is 1.2 times lower than corresponding index in initial cultures ($95.2 \pm 4.5\%$). The viability index of cryopreserved CCC was reduced in 1.2 times *versus* initial cultures ($97.4 \pm 5.8\%$) and made $80.2 \pm 4.4\%$.

The next stage of the work was the examining of proliferative characteristics of cryopreserved cultures of bone marrow MSCs and CCC (Fig. 1). In the studied cultures the cells which adhered to plastic were of fibroblast-like morphology and formed the monolayer sites with 10–15 cells to the 5–7th observation day. To the 14th day of culturing of bone marrow MSCs there was observed 75% confluent, in the case of CCC the density of monolayer reached 90% (Fig. 2). Dynamics of the growth of the studied cultures was similar but

відносно початкових культур ($97,4 \pm 5,8\%$) та склав $80,2 \pm 4,4\%$.

Наступним етапом роботи було визначення проліферативних характеристик кріоконсервованих культур МСК кісткового мозку та ККХ (рис. 1). У досліджених культурах клітини, які адгезували до пластика, мали фібробластоподібну морфологію та утворювали ділянки моношару з 10–15 клітин на 5–7-му добу спостереження. На 14-ту добу культивування МСК кісткового мозку спостерігався 75%-й конфлюент, у випадку ККХ щільність моношару досягла 90% (рис. 2). Динаміка зростання досліджених культур була схожою, але кількість клітин на cm^2 була більшою у ККХ під час всього строку спостереження. Слід зазначити, що на 3–4-му пасажі досліджувані кріоконсервовані культури мали більш високу здатність до проліферації, ніж на 0-му пасажі. Це явище, ймовірно, пов'язано, з одного боку, з пригніченням проліферативної активності після кріоконсервування, а з другого – адаптацією клітин до культуральних умов [6, 9].

Отримані експериментальні дані щодо спрямованого диференціювання досліджених культур показали, що перші ознаки адипоцитарного диференціювання, які виражалися в зміні морфології клітин (округлість, зернистість цитоплазми), спостерігали на 5–7-му добу у випадку МСК кісткового мозку та на 8–10-ту добу – у випадку ККХ. Цитохімічне фарбування досліджених культур барвником Sudan IV на 21-шу добу після початку адипоцитарного диференціювання виявило наявність ліпідних крапель, які були пофарбовані в оранжевий колір у цитоплазмі більш ніж $54,7 \pm 6,2\%$ в культурах МСК кісткового мозку та $24,6 \pm 7,3\%$ – в ККХ (рис. 3).

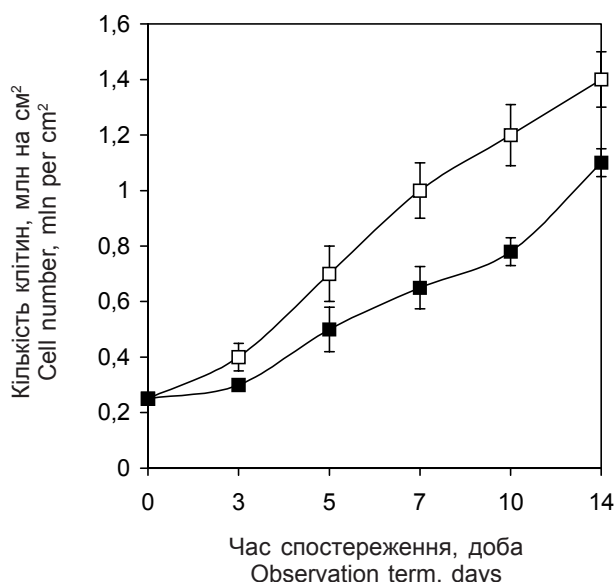


Рис. 1. Динаміка росту ККХ та МСК кісткового мозку після заморожування-відігріву, 0-й пасаж ($n = 5$): □ – ККХ; ■ – МСК кісткового мозку.

Fig. 1. Growth dynamics of CCCs and bone marrow MSCs after freeze-thawing, 0 passage ($n = 5$): □ – CCCs; ■ – bone marrow MSCs.

the number of cells per cm^2 was higher in CCC during the whole observation term. It should be noted that at 3–4th passage the investigated cryopreserved cultures had higher ability to proliferation versus passage 0. This phenomenon is likely related from one side to the suppression of proliferative activity after cryopreservation and from another one it is associated with adaptation of cells to cultural conditions [6, 9].

The obtained experimental data as for the directed differentiation of the studied cultures have shown that

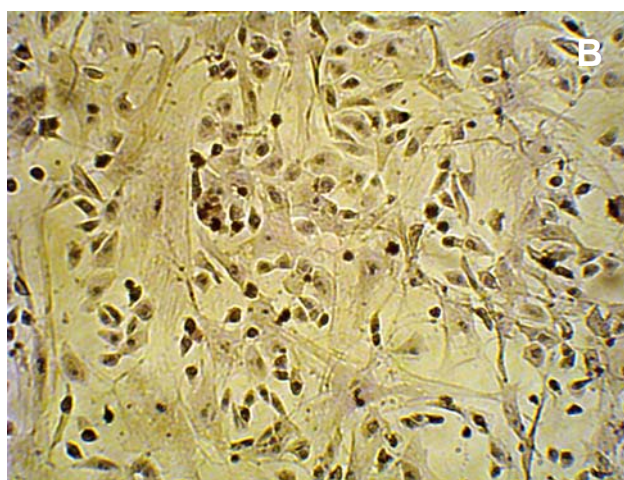
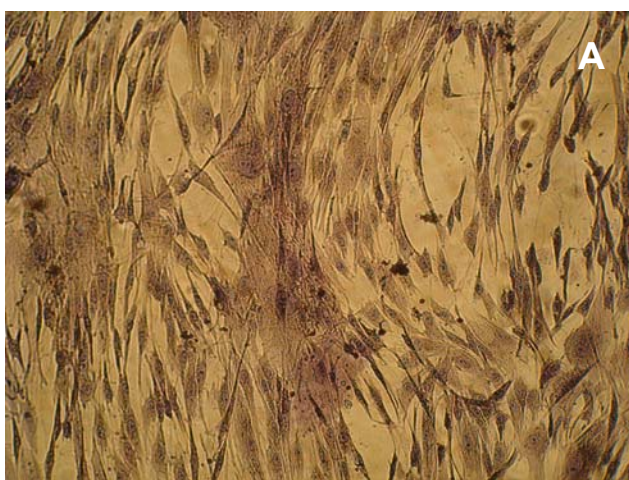


Рис. 2. Культури ККХ (А) і МСК кісткового мозку (В) після заморожування-відігріву, 0-й пасаж, $\times 250$, світлова мікроскопія, фарбування гематоксиліном і еозином.

Fig. 2. Microphoto of CCCs (A) and bone marrow MSCs (B) after freeze-thawing, 0 passage, $\times 250$, light microscopy, hematoxylin and eosin staining.

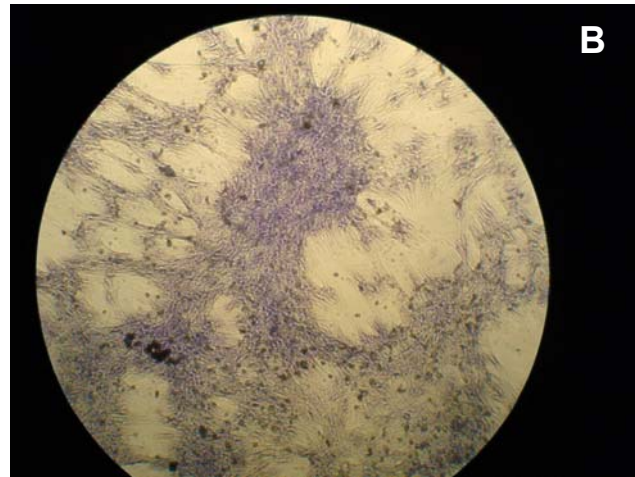
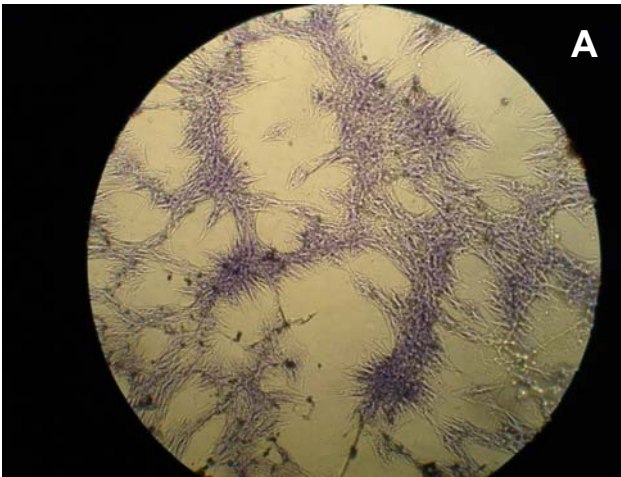


Рис. 3. Спрямоване хондрогенне диференціювання ККХ (А) і МСК кісткового мозку (В) після заморожування-відігріву, $\times 250$, світлова мікроскопія, фарбування Toluidine blue.

Fig. 3. Directed chondrogenic differentiation of CCCs (A) and bone marrow MSCs (B) after freeze-thawing, $\times 250$, light microscopy, Toluidine blue staining.

У морфології контрольних зразків зазначених змін не було виявлено.

При дослідженні спрямованого хондрогенного диференціювання перші ознаки зміни морфології у випадку МСК кісткового мозку спостерігали на 3–4-ту добу культивування та на 5–6-ту добу – у випадку ККХ. З 8-ї доби хондрогенного диференціювання в культурах спостерігали ділянки з концентрацією клітин, більшою в порівнянні з ділянками навколо. При подальшому спостереженні щільність клітин збільшувалася та на 21-шу добу відмічалось утворення оформлених структур із значною масою екстрацелюлярного матриксу, що підтверджувалося фарбуванням культур Toluidine blue на наявність протеогліканів (рис. 4). Загальний відсоток диференційованих у хондрогенному напрямку клітин МСК кісткового мозку становив $70,3 \pm 5,6\%$, а у випадку ККХ – $58,2 \pm 4,8\%$. При цьому ознак спонтанного диференціювання у морфології контрольних зразків не спостерігалось. Порівняння зазначених кріоконсервованих культур показало, що МСК і ККХ мають здатність до спрямованого мультилінійного мезенхімального диференціювання.

Підсумовуючи отримані дані, можна заключити, що кріоконсервованим культурам МСК кісткового мозку на початкових етапах властиві повільна проліферація та високий потенціал до диференціювання. Культури клітин хоріона за однакових умов кріоконсервування мали більшу здатність до проліферації та нижчу – до диференціювання, ніж МСК кісткового мозку. Поряд із кістковим мозком, який є найбільш поширеним джерелом стовбурових клітин, тканина хоріона може бути альтернативним

the first signs of adipocytic differentiation manifested in the alteration of cell morphology (roundure, cytoplasm granulation) were found to the 5–7th day in case of bone marrow MSCs and to the 8–10th day in the case of CCC. Cytochemical staining of the studied cultures with Sudan IV stain to the 21st day after the start of adipocytic differentiation revealed the presence of lipid drops which were colored orange in cytoplasm more than $54.7 \pm 6.2\%$ in cultures of bone marrow MSCs and $24.6 \pm 7.3\%$ in CCCs (Fig. 3). In morphology of the control samples no mentioned changes were revealed.

When studying the directed chondrogenic differentiation the first signs of the changes in morphology in case of bone marrow MSCs were observed to the 3–4th culturing day and to the 5–6th in the case of CCC. From the 8th day of chondrogenic differentiation in the cultures there were observed the sites of increased concentration of cells if compared with the surrounding ones. During following observation the density of cells increased and to the 21st day there was noted the formation of the shaped structures with a significant mass of extracellular matrix, which was confirmed with the staining of the cultures with Toluidine blue for the presence of proteoglycans (Fig. 4). Total percentage of differentiated towards chondrogenic lineage cells of bone marrow MSCs made $70.3 \pm 5.6\%$ and in the case of CCC it was $58.2 \pm 4.8\%$. Herewith no signs of spontaneous differentiation in morphology of the control samples were noted. The comparison of the mentioned cryopreserved cultures has shown that MSCs and CCC have the ability to the directed multilineal mesenchymal differentiation.

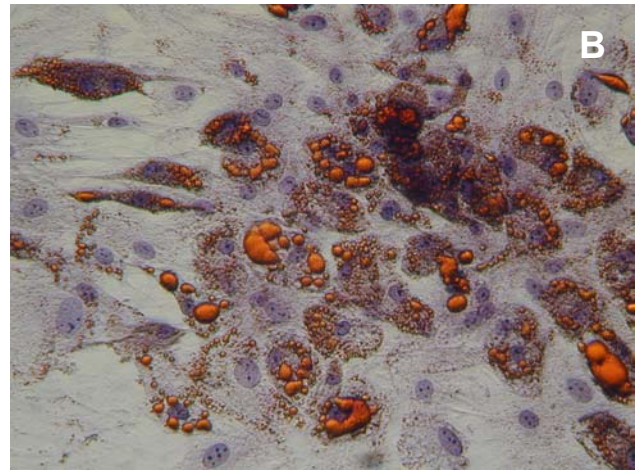
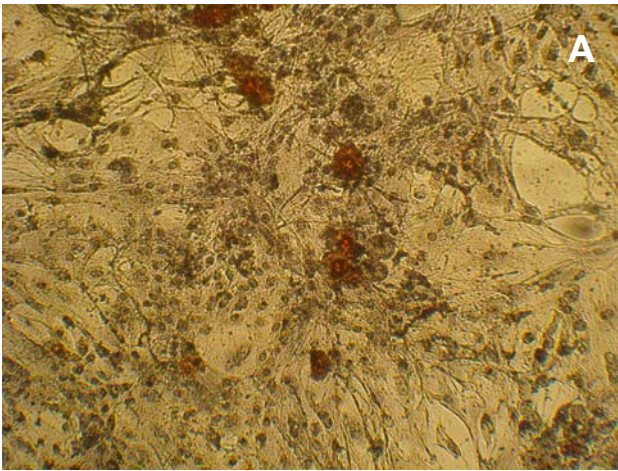


Рис. 4. Спрямоване адипогенне диференціювання ККХ (А) і МСК кісткового мозку (В) після заморожування-відігріву, $\times 250$, світлова мікроскопія, фарбування Sudan I.

Fig. 4. Directed adipogenic differentiation of CCCs (A) and bone marrow MSCs (B) after freeze-thawing, $\times 250$, light microscopy, Sudan IV staining.

джерелом для отримання культур стромальних клітин.

Результати проведених раніше досліджень [2] по кріоконсервуванню ККХ показали, що оптимальною є програма з охолодженням від 25 до -6°C зі швидкістю 1 град/хв, з наступним сидінгом та охолодженням до -80°C зі швидкістю 10 град/хв і зануренням у рідкий азот. Використання зазначеної програми забезпечує після відігріву як високу збереженість популяції ККХ в цілому (життєздатність $82,4 \pm 5,7\%$ та формування щільного моношару на 14-ту добу культивування), так і виживання фракції мультипотентних клітин. Аналогічні результати збереження морфофункціональних характеристик ККХ отримані в цій роботі з використанням програми кріоконсервування з повільним охолодженням. Ймовірно, в процесі культивування стромальні клітини набувають стійкості до переохолодження, що дає можливість консервувати ці клітини без застосування сидінга з низькою швидкістю охолодження [4, 6, 9]. Таким чином, для стандартизації та спрощення процесу кріоконсервування стовбурових клітин з різних джерел можливим є використання двохетапної програми з низькою швидкістю охолодження та суміші 10% ДМСО та 20% FBS як кріопротектора, що дозволяє зберегти ростові характеристики та здатність до спрямованого диференціювання. Результати проведеного дослідження узгоджуються з даними робіт щодо впливу низькотемпературного консервування на морфофункціональні властивості МСК [4, 11–13, 18] та можуть використовуватися при створенні кріобанку перспективних ліній клітин стромального походження з

To summarize the data obtained one may conclude that to cryopreserved cultures of bone marrow MSCs at initial stages slow proliferation and high potential to differentiation are inherent. Chorion cell cultures under similar cryopreservation conditions has a high ability to proliferation and lower one to differentiation if compared with bone marrow MSCs. Along with bone marrow which is the most wide spread source of stem cells, chorion tissue can be an alternative source for obtaining the cultures of stromal cells.

The results of the performed previously researches [2] on cryopreservation of CCC have shown that optimal one is the program with cooling from 25 down to -6°C with the rate of 1 deg/min with following seeding and cooling down to -80°C with the rate of 10 deg/min and plunging into liquid nitrogen. Use of the mentioned program provides after thawing both a high preservation of CCC population in a whole (viability of $82.4 \pm 5.7\%$ and formation of dense monolayer to the 14th culturing day) and survival of the fraction of multipotent cells. The same results of preservation of CCC morphofunctional characteristics were obtained in the presented work using the cryopreservation program with low cooling rate. During culturing process of stromal cells are likely getting resistance to overcooling, giving the possibility to cryopreserve these cells using no seeding with low rate [4, 6, 9]. Thus to standardize and simplify the cryopreservation process of stem cells of different origins the use of two-stage program with low cooling rate and mixture of 10% DMSO and 20% FBS as cryoprotectants enabling to preserve the growth characteristics and ability to directed differentiation is possible. The results of the performed studies are in

можливістю їх наступного застосування для потреб біотехнології та клітинної терапії.

Висновки

Проведено порівняльне дослідження впливу однакових умов низькотемпературного консервування культур клітин стромального походження, отриманих з різних джерел, а саме кісткового мозку та тканини хоріона. Встановлено, що кріоконсервування досліджених культур з застосуванням низької швидкості охолодження (1 град/хв) до -80°C та середовища кріоконсервування (10% ДМСО та 20% ЕС) дозволяє зберегти цілісність мембрани клітин, їх проліферативні характеристики та здатність до спрямованого диференціювання.

Література

1. *Адамс Р.* Методи культури клеток для биохимиков. – М.: Мир, 1983. – 264 с.
2. *Гончарук О.І., Волкова Н.О., Грищенко В.І.* Вплив кріоконсервування на проліферативні характеристики і потенціал диференціювання культивованих клітин хоріона // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т.20, №3. – С.309–317.
3. Методи культивирования клеток. Сб. научных трудов / Под. ред. Г.П. Пинаева. – Л.: Наука, 1988. – 287 с.
4. *Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г., Волкова Н.А., Петренко А.Ю.* Характеристика иммунофенотипа и дифференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека после кріоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №4. – С. 436–442.
5. *Суздальцев Ю.Г., Бурунова В.В., Вахрушев И.В. и др.* Сравнение способности к дифференцировке в ткани мезодермального происхождения мезенхимальных клеток человека, выделенных из разных источников // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – №1. – С. 3–10.
6. *Труфанова Н.А., Петренко Ю.А., Петренко А.Ю.* Влияние кріоконсервирования на жизнеспособность, иммунофенотип и дифференцировочные свойства мезенхимальных стромальных клеток ранних стадий органогенеза // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №2. – С. 135–144.
7. *Angelo P.C., Ferreira A.C., Fonseca V.D. et al.* Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells // Genet. Mol. Res. – 2012. – Vol. 11, №2. – P.1002–1012.
8. *Baksh D., Yao R., Tuan R.* Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25, №4. – P.1384–1392.
9. *Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M. et al.* Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97, N7. – P. 3213–3218.
10. *Diaz-Prado S., Muinos-Lopez E., Hermida-Gomez T. et al.* Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane // J. Cell Biochem. – 2010. – Vol. 111, N4. – P. 846–857.
11. *Gonda K., Shigeura T., Sato T.* Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after

accordance with the data of the reports as for the effect of low temperature preservation on morphofunctional properties of MSCs [4, 11–13, 18] and may be used when establishing the cryobank of perspective lines of the cells of stromal origin with their possible following application for the demands of biotechnology and cell therapy.

Conclusions

There was performed a comparative study of the similar conditions of low temperature preservation of cell cultures of stromal origin derived from different sources namely of chorion tissues. It has been established that cryopreservation of the studied cultures using low cooling rate (1 deg/min) down to -80°C and cryopreservation medium (10% DMSO and 20% FBS) allows the keeping an integrity of cell membrane, their proliferative characteristics and ability to the directed differentiation.

References

1. *Adams R.* Methods of cell culture for biochemists. – Moscow: Mir, 1983. – 264 p.
2. *Goncharuk E.I., Volkova N.A., Grischenko V.I.* Cryopreservation effect on proliferation characteristics and differentiation potential of cultured chorion cells // Problems of Cryobiology. – 2010. – Vol. 20, N3. – P. 309–317.
3. Methods of cell culturing: Collection of Scientific Papers/ Ed. by G.P. Pinaeva. – Leningrad: Nauka, 1988. – 287 p.
4. *Petrenko Yu.A., Skorobogatova N.G., Volkova N.A., Petrenko A.Yu.* Characterization of immunophenotype and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells after cryopreservation // Problems of Cryobiology. – 2010. – Vol. 20, N4. – P. 436–442.
5. *Suzdaltsev Yu.G., Burunova V.V., Vakhrushev I.V. et al.* Comparison of ability to differentiation in tissue of mesodermal origin of human mesenchymal cells, derived from different sources // Kletochnye tehnologii v biologii i meditsine. – 2007. – N1. – P. 3–10.
6. *Trufanova N.A., Petrenko Yu.A., Petrenko A.Yu.* Effect of cryopreservation on viability, immunophenotype and differentiation properties of mesenchymal stromal cells of early organogenetic stage // Problems of Cryobiology. – 2010. – Vol. 20, N2. – P. 135–144.
7. *Angelo P.C., Ferreira A.C., Fonseca V.D. et al.* Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells // Genet. Mol. Res. – 2012. – Vol. 11, N2. – P.1002–1012.
8. *Baksh D., Yao R., Tuan R.* Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25, N4. – P.1384–1392.
9. *Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M. et al.* Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97, N7. – P. 3213–3218.
10. *Diaz-Prado S., Muinos-Lopez E., Hermida-Gomez T. et al.* Multilineage differentiation potential of cells isolated from the

- long-term cryopreservation // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2008. – Vol. 121, №2. – P. 401–410.
12. *Haack-Sorensen M., Bindslev L., Mortensen S. et al.* The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use // *Cytherapy.* – 2007. – Vol. 9, №4. – P. 328–337.
 13. *Haack-Sorensen M., Kastrup J.* Cryopreservation and revival of mesenchymal stromal cells // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 698, №1. – P. 161–174.
 14. *Hegyí B., Sági B., Kovacs J.* Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall // *Int. Immunology.* – 2010. – Vol. 22, №7. – P. 551–559.
 15. *Maddalena S., Elsa V., Lucia G. et al.* Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2007. – Vol. 1, №4. – P. 296–305.
 16. *Mamidi M.K., Nathan K.G., Singh G. et al.* Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation // *J. Cell Biochem.* – 2012. – Vol. 113, №10. – P. 3153–3164.
 17. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* – 1999. – Vol. 284, №2. – P. 143–147.
 18. *Tokumoto S., Sotome S., Torigoe I. et al.* Effects of cryopreservation on bone marrow derived mesenchymal cells of a nonhuman primate // *J. Med. Dent. Sci.* – 2008. – Vol. 55, №1. – P. 137–143.
 11. *Gonda K., Shigeura T., Sato T.* Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2008. – Vol. 121, N2. – P. 401–410.
 12. *Haack-Sorensen M., Bindslev L., Mortensen S. et al.* The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use // *Cytherapy.* – 2007. – Vol. 9, N4. – P. 328–337.
 13. *Haack-Sorensen M., Kastrup J.* Cryopreservation and revival of mesenchymal stromal cells // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 698, N1. – P. 161–174.
 14. *Hegyí B., Sági B., Kovacs J.* Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall // *Int. Immunology.* – 2010. – Vol. 22, N7. – P. 551–559.
 15. *Maddalena S., Elsa V., Lucia G. et al.* Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2007. – Vol. 1, N4. – P. 296–305.
 16. *Mamidi M.K., Nathan K.G., Singh G. et al.* Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation // *J. Cell Biochem.* – 2012. – Vol. 113, N10. – P. 3153–3164.
 17. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* – 1999. – Vol. 284, N2. – P. 143–147.
 18. *Tokumoto S., Sotome S., Torigoe I. et al.* Effects of cryopreservation on bone marrow derived mesenchymal cells of a nonhuman primate // *J. Med. Dent. Sci.* – 2008. – Vol. 55, N1. – P. 137–143.

Надійшла 1.06.2012

Accepted 1.06.2012