

УДК 576.5.083:616.71-092.4  
doi:10.22494/cot.v4i2.64

# Морфофункціональні характеристики кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканини



Волкова Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М.  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна  
e-mail: volkovanatali2006@yandex.ua

## РЕЗЮМЕ

Сучасні підходи в кріоконсервуванні мультипотентних стовбурових клітин з різних джерел мають на меті максимальне збереження усіх характеристик вихідного клітинного продукту для подальшого використання його в експериментальних або клінічних дослідженнях.

**МЕТА РОБОТИ.** Порівняти морфофункціональні характеристики кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), які були отримані з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** ММСК отримували з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин щурів за стандартними методиками. Кріоконсервування клітин проводили під захистом 10 % ДМСО та 20 % фетальної сироватки корів із застосуванням низької швидкості охолодження 1 град/хв. до  $-80^{\circ}\text{C}$  з наступним зануренням в рідкий азот. В досліджених культурах оцінювали цілісність мембрани, імунофенотип, здатність до проліферації (МТТ-тест), колонієутворення, спрямованого диференціювання та синтезу колагену I типу.

**РЕЗУЛЬТАТИ.** Досліджені кріоконсервовані культури клітин, що були отримані з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин, мали високі показники цілісності мембрани, колонієутворення та проліферації, а також здатність до спрямованого адипогенного та хондрогенного диференціювання. Імунофенотипічний аналіз показав, що досліджені кріоконсервовані культури ММСК характеризувалися високим рівнем експресії ( $\geq 90\%$ ) CD44, CD90, CD105, CD73 та низьким рівнем експресії ( $\leq 1\%$ ) гемопоетичного маркера CD45. Кріоконсервовані ММСК кісткового мозку характеризувалися високим вмістом клітин, які синтезували колаген I типу, у порівнянні з культурами, що були отримані із сухожиль і жиру.

**ВИСНОВКИ.** Клітинні культури, отримані з усіх досліджених джерел, мають імунофенотип клітин-попередників мезенхімального походження. ММСК сухожильної тканини характеризувалися більшою здатністю до колонієутворення, проліферації та нижчою здатністю до спрямованого адипогенного диференціювання, ніж ММСК з кісткового мозку і жирової тканини.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини; кріоконсервування; колонієутворююча одиниця; диференціювання клітин

Виділення, культивування та кріоконсервування клітин мезенхімального походження є базою для отримання клітинного матеріалу, який використовується в регенеративній медицині для терапії захворювань різного ґенезу. На сьогодні мезенхімальні стовбурові клітини виділяють з різних тканин, таких як кістковий мозок, жир, пуповинна кров, шкіра та деякі інші [1-5]. Через свої властивості мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) є предметом особливої уваги, оскільки вони здатні до диференціювання в спеціалізовані

клітини, підтримують гемопоез і володіють трофічними та імуномодулюючими властивостями завдяки їх здатності до секреції цитокінів, хемокінів та факторів росту. В цілому, ці властивості роблять їх одним з головних кандидатів для біотехнологічних та тканинно-інженерних розробок [1, 6, 7].

У 2006 році Міжнародне товариство клітинної терапії (ISCT) запропонувало основні критерії для визначення ММСК, а саме: фібробластоподібні адгезивні до пластику клітини, які є CD105, CD73,

CD90 позитивними та CD45, CD34, CD14 або CD11b, CD19 або CD79a і HLA-DR негативними, здатними до спрямованого диференціювання в адипогенному, остеогенному і хондроенному напрямках. Цей мінімальний набір ідентифікаційних критеріїв ММСК зовсім не пов'язаний з джерелом їх походження [1, 2, 4, 8-10]. Слід зазначити, що культивування, диференціювання, кріоконсервування ММСК *in vitro* можуть змінювати природні властивості клітин [11-13]. Тому для створення нових біотехнологічних розробок важливо використовувати клітинні лінії із визначеними стабільними морфофункціональними властивостями.

На сьогодні в якості джерела стовбурових клітин дорослих донорів досить добре досліджено кістковий мозок. Зважаючи на те, що ММСК кісткового мозку є мультипотентними і здатними до проліферації *in vitro*, їх досить швидко стали використовувати у ранніх клінічних дослідженнях [14, 15, 16]. Слід зазначити, що ММСК складають лише невелику частку клітин кісткового мозку (0,01-0,001 % ядерних клітин), а їх кількість та потенціал диференціації мають негативну кореляцію з віком. Згодом ММСК, що мають аналогічний імунофенотип, були виділені також з інших тканин.

Альтернативним джерелом ММСК для клітинної терапії є жирова тканина, з якої вони можуть бути отримані за допомогою менш інвазивних методів у значно більших кількостях, у порівнянні з кістковим мозком. Ці клітини можуть бути легко виділені з ліпоаспірату та здатні диференціюватися в остеогенному, адипогенному, міогенному, хондроенному і нейрогенному напрямках [1, 17, 18].

Стовбурові клітини з сухожильної тканини на сьогоднішній день розглянуті у небагатьох дослідженнях *in vivo* та *in vitro*. Вивчено проліферативний потенціал та здатність до мультилінійного диференціювання клітин-попередників сухожильної тканини, виділених з підколінного сухожилля людини [7, 9]. Це спостереження дозволило значно просунути у розумінні патофізіології сухожильної тканини, а також зробило внесок у пошук нового потенційного інструменту для терапії пошкоджень сухожиль.

Трансплантація аутологічних або алогенних ММСК являє собою форму клітинної терапії та має значні перспективи у лікуванні багатьох захворювань людини. Залучення сучасних технологій культивування та кріоконсервування дозволяють отримати запас стовбурових та спеціалізованих клітин з наступним їх тривалим зберіганням при низьких температурах, що дозволяє їх вільно транспортувати та заморожувати безпосередньо перед терапевтичним застосуванням. Для того щоб забезпечити базу для подальших досліджень в області регенеративної медицини, було проаналізовано ММСК щурів, отриманих з кількох джерел. Це дослідження представляє порівняння кріоконсервованих ММСК для створення експериментальної системи оцінки та вибору оптимального джерела клітин для терапії ушкодження опорно-рухового апарату.

**МЕТА РОБОТИ** – визначити та порівняти окремі морфофункціональні характеристики кріоконсервованих ММСК, які були отримані з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

**Отримання та культивування ММСК.** ММСК кісткового мозку щурів виділяли з діафізів стегнових кісток. Клітини виділяли шляхом вимивання за допомогою розчину Хенкса (PAA, Австрія) з наступним пропусканням суспензії крізь голки з діаметром, що зменшувався. Наступний етап включав центрифугування при 834g протягом 5 хв.

Первинну суспензію клітин з жирової та сухожильної тканин щурів отримували шляхом ферментативної обробки біопатів. Для цього зразки тканин масою  $75 \pm 3$  мг промивали розчином Хенкса (PAA, Австрія) з гентаміцином 150 мкг/мл (Фармак, Україна) та інкубували у розчині колагену II типу 1,5 мг/мл (ЛанЕко, Росія) при 37 °C протягом 18 год. Клітини виділяли з фрагментів шляхом ресуспендування з наступним центрифугуванням при 834g протягом 3 хв.

Отримані суспензії клітин висівали в культуральні флакони площею 25 см<sup>2</sup> (PAA, Австрія) в кількості 10<sup>3</sup> клітин/см<sup>2</sup> флакону [19]. Середовище культивування в усіх випадках містило: поживне середовище IMDM (PAA, Австрія), 10 % ембріональної сироватки корів (HyClone, США), канаміцин 150 мкг/мл (Фармак, Україна) та амфотерицин Б 5 мкг/мл (PAA, Австрія). Середовище змінювали кожні три доби. У роботі були використані стандартні умови культивування при 37 °C в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub> з використанням інкубатора (Sanyo, Японія). Субкультивування проводили при досягненні конфлюентного моношару культури, який визначали на світловому мікроскопі (LOMO, Росія). В роботі використовували клітинні культури 3 пасажу.

**Кріоконсервування ММСК.** Кріоконсервування здійснювали в кріопробірках об'ємом 1 мл (Nunc, США) під захистом 10 % ДМСО (ЛанЕко, Росія) з додаванням 20 % ембріональної сироватки корів. Розчин кріопротектору готували на середовищі IMDM з канаміцином 150 мкг/мл. Охолодження зразків проводили за допомогою програмного заморозувача ЗПМ-1 (Отел, Україна). Швидкість охолодження складала 1 °C/хв. до -80 °C із подальшим зануренням пробірок у рідкий азот [20]. Відігрів кріоконсервованих ММСК здійснювали на водяній бані при 40 °C до появи рідкої фази. Видалення кріопротектору проводили шляхом додавання 1:9 розчину Хенкса (PAA, Австрія) з наступним центрифугуванням при 834g протягом 5 хв. При культивуванні досліджуваних культур після кріоконсервування застосовували такі ж умови, як і для початкових культур. Цілісність мембрани клітин оцінювали за тестом на виключення суправітального барвника трипанового синього (Sigma, США).

**Імунофенотипування ММСК.** Для імунофенотипічного аналізу ММСК після заморожування-відігріву фарбували моноклональними антитілами mouse anti-human CD45-FITC, CD44-FITC, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE (BD Biosciences, США) згідно інструкції фірми виробника. Вимірювання проводили на проточному цитометрі BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Результати аналізували за допомогою програми Win MDI v.2.8.

**Оцінка колонієутворюючої активності ММСК.** Ефективність клонування визначали підрахунком колоній, що містять не менше 30 клітин, і розраховували як відсоток колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУО-ф) на 1•10<sup>6</sup> посаджених клітин. Клітини висівали у 6-луноквих планшетах при низькій щільності лімітуючим розведенням (починаючи з концентрації: 100 клітин/см<sup>2</sup>; закінчуючи концентрацією 15 клітин/см<sup>2</sup>) і культивували в середовищі, що містить IMDM з 20 % ембріональної сироватки корів протягом 14 днів. Потім клітини фіксували 4 % розчином параформальдегіду з наступним фарбуванням азури-ІІ та еозином за Романовським-Гімза протягом 10 хв. при кімнатній температурі. Підраховували число колоній, визначали їх розмір і кількість клітин [17].

**Оцінка проліферації ММСК.** В досліджених культурах ММСК на строках культивування 1, 3, 7 та 10 днів визначали кількість життєздатних клітин за допомогою МТТ-тесту (Sigma, США) [21]. Вимірювання оптичної щільності проводили на фотоколориметрі КФК-2-УХЛ42 (Росія) при довжині хвилі 540 нм.

**Імуноцитохімічне дослідження на колаген I типу.** Забарвлення на колаген I типу проводили з використанням моноклональних антитіл до колагену I типу COL-1 (Sigma-Aldrich, США) в титрі 1:2000 та CFTM488A (Sigma-Aldrich, США) згідно інструкції фірми виробника. Ядра клітин додатково забарвлювали DAPI (Sigma, США) в концентрації 1 мкг/мл, експозиція 30 хв. Люмінесцентну мікроскопію препаратів зразків ММСК проводили за допомогою конфокального скануючого мікроскопа LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина).

ЗРАЗОК	РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРУ, %				
	CD 44	CD 45	CD 73	CD 90	CD 105
ММСК кісткового мозку	97,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1	97,3 ± 0,8	91,5 ± 1,2	95,4 ± 0,4
ММСК жирової тканини	93,4 ± 0,6	0,8 ± 0,3	90,7 ± 0,5	89,2 ± 0,9	95,1 ± 0,8
ММСК сухожильної тканини	96,1 ± 0,3	0,6 ± 0,1	89,5 ± 1,1	92,1 ± 0,7	94,4 ± 0,6

Таблиця 1. Імунофенотип ММСК кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин (n = 6, M ± m).

#### Спрямоване адипогенне диференціювання.

Для спрямованого диференціювання в адипогенному напрямку по досягненню культурами конфлюентного стану проводили зміну звичайного поживного середовища на середовище диференціювання, яке складалося з IMDM, 1 % ембріональної сироватки корів,  $10^{-7}$  М дексаметазону,  $10^{-9}$  М інсуліну (все – PAA, Австрія). Подальше культивування проводили протягом 3 тижнів зі зміною середовища 2 рази на тиждень. Для підтвердження диференціювання клітини фарбували Sudan IV (Fluka, Німеччина) та підраховували у світловому мікроскопі кількість клітин з ліпідними краплями, які мали помаранчеве забарвлення, розраховуючи відсоток до загальної кількості клітин. Контролем на спонтанне диференціювання були клітини, культивовані у відсутності спеціальних індукторів.

#### Спрямоване хондрогенне диференціювання.

Для спрямованого диференціювання в хондрогенному напрямку по досягненню культурами конфлюентного стану проводили зміну звичайного поживного середовища на середовище диференціювання – IMDM,  $10^{-5}$  аскорбат-2-фосфату (PAA, Австрія), 10 нг/мл TGF- $\beta$  (Sigma, США). Подальше культивування проводили протягом 3 тижнів зі зміною середовища 2 рази на тиждень. Для підтвердження диференціювання культури забарвлювали Toluidine blue (Fluka, Німеччина) та підраховували кількість клітин з наявністю протеогліканів в екстрацелюлярному матриксі, які мали синє забарвлення (n = 5). Кількість диференційованих клітин підраховували у світловому мікроскопі та визначали їх відсоток до загальної кількості клітин. Контролем на спонтанне диференціювання були клітини, культивовані у відсутності спеціальних індукторів [22].

**Статистична обробка результатів.** Перевірка нормальності розподілу кількісних ознак проводилася з використанням спільного критерію перевірки на симетричність і нульового коефіцієнту ексцесу. При нормальному розподілі змінних достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента. Відмінності між групами порівняння статистично достовірні при  $p \leq 0,05$ . Аналіз даних проводився з використанням пакетів програм MS Excel (Microsoft, США) та Statistica 8 (StatSoft Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Першим етапом роботи було дослідження цілісності мембран клітин після кріоконсервування з використанням тесту на виключення трипанового синього. ММСК кісткового мозку після кріоконсервування-відігріву мали  $78,5 \pm 6,2$  % клітин з неушкодженою мембраною, що у 1,24 разу нижче відповідного показника у початкових культурах ( $95,2 \pm 4,5$  %). Показник життєздатності у випадку кріоконсервованих ММСК жирової тканини був знижений у 1,18 разу відносно початкових культур ( $97,4 \pm 5,8$  %) та складав  $80,2 \pm 4,4$  %. Зниження відсотку життєздатних клітин спостерігалось також в ММСК сухожильної тканини після кріоконсервування  $79,3 \pm 3,2$  %, а саме в 1,19 разу стосовно нативного аналогу ( $94,4 \pm 3,4$  %).

Популяції ММСК, отриманих з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин, характеризувалася імунофенотипом, що наведений у таблиці 1. Досліджені кріоконсервовані культури виявили типовий

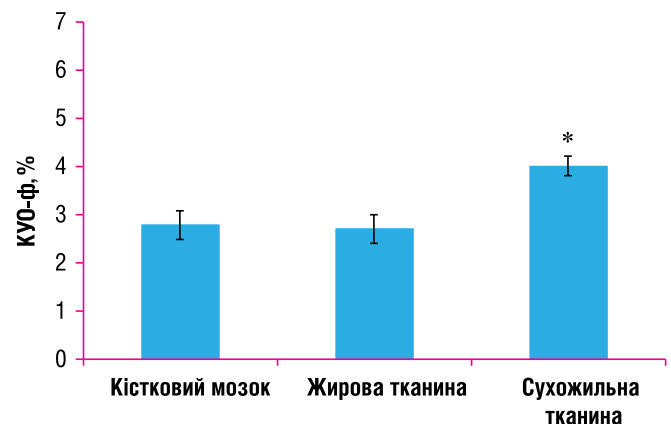


Рис. 1. Відносний вміст колонієутворюючих клітин-фіброblastів в культурах кріоконсервованих ММСК кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин (n = 6, M ± m).

\* – відмінності достовірні у порівнянні з відповідним показником ММСК кісткового мозку,  $p \leq 0,05$ .

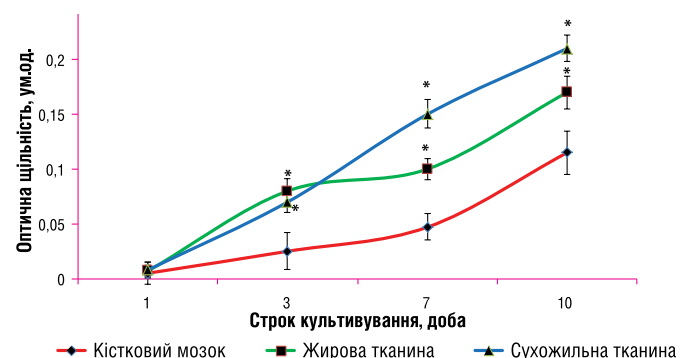


Рис. 2 Показники оптичної щільності середовища за результатами МТТ-тесту в динаміці культивування кріоконсервованих ММСК кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин (n = 6, M ± m).

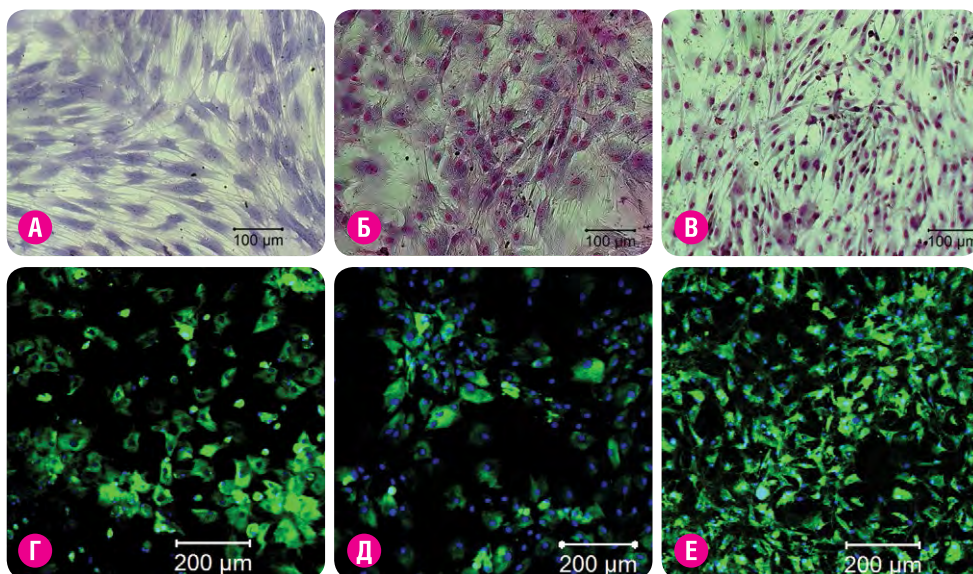
\* – відмінності достовірні у порівнянні з відповідним показником МСК кісткового мозку,  $p \leq 0,05$ .

для ММСК фенотип з високим рівнем експресії ( $\geq 90$  %) CD44, CD90, CD105, CD73 та низьким рівнем експресії ( $\leq 1$  %) гемопоетичного маркеру CD45, що відповідало імунофенотипу відповідних культур до кріоконсервування (дані не наведені).

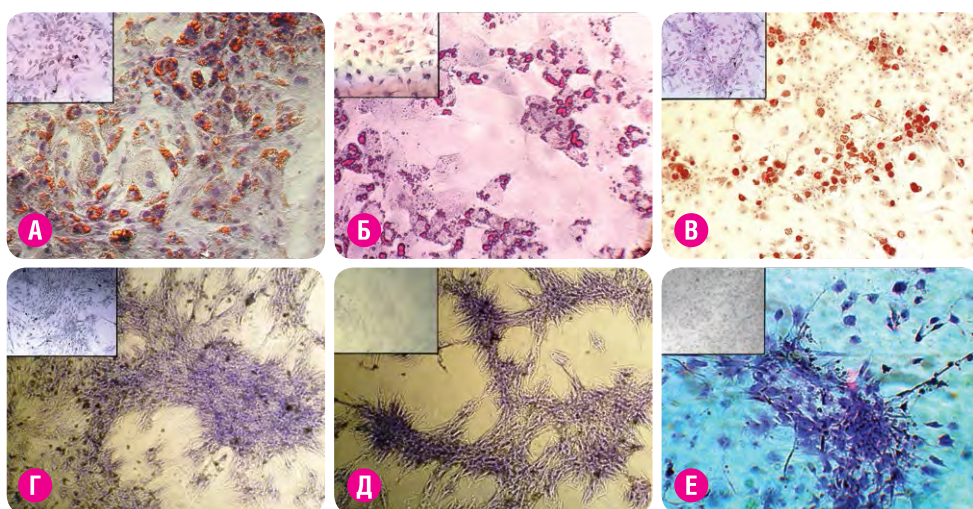
Відомо, що культивування клітин при низькій щільності посіву дозволяє виявити колонієутворюючі одиниці фіброblastів, які являють собою найбільш ранні представники пулу стромальних клітин [5, 7]. Застосовуючи при посіві клітинну концентрацію 10-15 клітин/см<sup>2</sup> спостерігали колонії, які утворювалися з частотою 3-4 на 100000 посаджених клітин. Отримані результати представлені на рис. 1.

При дослідженні KVO-ф ММСК, отриманих з різних джерел, формувалися колонії декількох типів, які різнилися за кількістю клітин та лінійним розміром. Досліджені колонії були розподілені на три типи: компактні з лінійними розмірами в діаметрі 4,8-7,2 мм, дифузні –





**Рис. 3** Мікрофотографії ММСК кісткового мозку (А, Г), жирової (Б, Д) та сухожильної (В, Е) тканин на 10-у добу культивування. Світлова мікроскопія (А-В), забарвлення азуром-II і еозином. Люмінесцентна мікроскопія (Г-Е), імунофлуоресцентне забарвлення клітин на колаген I типу (зелений колір), ядра забарвлені DAPI (блакитний).



**Рис. 4** Мікрофотографії ММСК кісткового мозку (А, Г), жирової (Б, Д) та сухожильної (В, Е) тканин на 21-у добу диференціювання. Адипогенне диференціювання (А-В), забарвлення Sudan IV, 250x. Хондрогенне диференціювання (Г-Е), забарвлення Toluidine Blue, 250x. У верхньому куті мікрофотографій наведені відповідні контрольні зразки.

2,8-6,4 мм та змішані – 1,5-3,8 мм. Для аналізу відбирали лунки, що містили всі види колоній, які склалися з більш ніж 30 клітин [5, 7].

Аналіз кількісного співвідношення клітинних колоній виявив значні відмінності, а саме найбільший клоногенний потенціал виявили у ММСК сухожильної тканини, де спостерігали щільні і змішані колонії. Дифузні колонії були характерні для ММСК жирової тканини. Дослідження ММСК кісткового мозку також показало наявність щільних та змішаних колоній, однак їх кількість була вірогідно нижчою відносно сухожильної тканини. Вірогідної різниці в кількості КУО-ф між жировою тканиною та кістковим мозком виявлено не було (рис. 1).

Наступним етапом роботи було дослідження проліферативних характеристик кріоконсервованих ММСК кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин. У досліджених культурах клітини адгезували до пластику та утворювали кластери з 10-15 клітин на 5-7-у добу спостереження. Динаміка росту досліджених культур була схожою, але приріст клітин був вірогідно більшим у ММСК сухожильної тканини протягом усього строку спостереження. На 3-ю добу культивування в ММСК жирової тканини приріст клітин був вищим в 3,2 разу, в культурі з сухожиль – в 2,8 разу порівняно з стромальними клітинами кісткового мозку. На 7-у та 10-у добу культивування в ММСК жирової тканини досліджуваній показник був вище в 2,1 та 1,5 разу, з сухожиль – у 3,2 та 1,8 разу відповідно, порівняно з ММСК кісткового мозку (рис. 2, див. с. 196). Слід зазначити, що у наступних пасажах досліджувані кріоконсервовані культури мали більш високу здатність до проліферації, ніж відразу після розморожування. Це явище,

ймовірно, пов'язане, з одного боку, з пригніченням проліферативної активності після кріоконсервування, а з другого – адаптацією клітин до умов культивування [20, 23-25].

Морфологічні характеристики досліджених клітин та їх здатність до синтезу колагену I типу представлені на рис. 3. Кріоконсервовані ММСК кісткового мозку характеризувалися наявністю веретеноподібних та парусоподібних клітин, 89,6 ± 2,7 % яких були позитивно забарвлені на колаген I типу. ММСК жирової тканини були представлені парусоподібними, зірчатоподібними та веретеноподібними клітинними елементами. ММСК з сухожиль мали веретеноподібну та трикутну форми з однорідною щільністю цитоплазми. Відносна кількість клітин, що синтезували колаген I типу, в культурах ММСК з жирової та сухожильної тканин була меншою, ніж в ММСК кісткового мозку, та складала 52,6 ± 2,1 % і 63,4 ± 2,5 % відповідно.

Здатність до спрямованого адипогенного та хондрогенного диференціювання кріоконсервованих ММСК кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин представлені в таблиці 2 (див. с. 198) та рис. 4.

Перші ознаки адипогенного диференціювання, що проявлялись у зміні морфології клітин (округлість, зернистість цитоплазми), спостерігали на 5-7-у добу у випадку ММСК кісткового мозку та ММСК жирової тканини і на 8-10-у добу у випадку ММСК з сухожиль. Цитохімічне фарбування культур ММСК кісткового мозку та жирової тканини барвником Sudan IV на 21-у добу після початку адипоцитарного диференціювання виявило наявність ліпідних крапель, забарвлених в помаранчевий колір, у цитоплазмі більш ніж 54,7 ± 6,2 %

ЗРАЗОК	АДИПОГЕННЕ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ, НАЯВНІСТЬ ПОЗИТИВНИХ КЛІТИН ЗА ЗАБАРВЛЕННЯМ SUDAN IV		ХОНДРОГЕННЕ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ, НАЯВНІСТЬ ПОЗИТИВНИХ КЛІТИН ЗА ЗАБАРВЛЕННЯМ TOLUIDINE BLUE	
	Спонтанне диференціювання	Індуковане диференціювання	Спонтанне диференціювання	Індуковане диференціювання
ММСК кісткового мозку	-	+	-	+
ММСК жирової тканини	±	+	-	+
ММСК сухожильної тканини	-	±	-	+

Таблиця 2.  
Здатність до адипогенного та хондрогенного диференціювання ММСК кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин (n = 6).

Примітки: „+” – диференціювання понад 50 % клітин; „±” – диференціювання менш ніж 50 % клітин; „-” – відсутність диференціювання.

та  $62,7 \pm 5,3$  % клітин відповідно. В культурі ММСК сухожильної тканини кількість клітин з ознаками адипогенного диференціювання складала  $20,6 \pm 7,3$  %.

При дослідженні спрямованого хондрогенного диференціювання перші ознаки зміни морфології у випадку ММСК кісткового мозку та ММСК жирової тканини спостерігали на 3–4-у добу культивування та на 5–6-у добу – у випадку ММСК з сухожилля. З 8-ї доби хондрогенного диференціювання в культурах спостерігали ділянки підвищеної концентрації клітин. При подальшому спостереженні щільність клітин збільшувалася та на 21-у добу відмічалася утворення оформлених структур із значною масою екстрацелюлярного матриксу, що підтверджувалося забарвленням їх Toluidine blue на наявність протеогліканів. Загальний відсоток диференційованих у хондрогенному напрямку клітин ММСК кісткового мозку становив  $70,3 \pm 5,6$  %, ММСК жирової тканини –  $68,7 \pm 7,1$  % та ММСК з сухожилля –  $68,2 \pm 4,8$  %.

Таким чином, поряд із кістковим мозком та жировою тканиною, які є найбільш поширеним джерелом стовбурових клітин, альтернативним джерелом ММСК може бути тканина сухожилля. Результати проведеного дослідження можуть бути використані для створення кріобанку перспективних ліній клітин стромального походження з можливістю їх наступного застосування для потреб біотехнології та клітинної терапії ушкоджень опорно-рухового апарату. Проведене дослідження морфологічних характеристик культур ММСК показало, що їх кріоконсервування із застосуванням низької швидкості охолодження  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$  до  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  та середовища кріоконсервування (10 % ДМСО та 20 % ембріональної сироватки корів) дозволяє зберегти цілісність мембрани клітин, імунофенотип, здатність до коло-

нієутворення, проліферації, синтезу колагену I типу та спрямованого диференціювання незалежно від джерела їх отримання.

Проте при порівняльному аналізі цих характеристик на початкових етапах культивування було встановлено, що ММСК кісткового мозку та жирової тканини властива повільна проліферація, низька здатність до колонієутворення та високий потенціал до адипогенного і хондрогенного диференціювання. ММСК тканини сухожилля за тих же умов кріоконсервування мають більший потенціал до проліферації, колонієутворення та нижчу здатність до спрямованого диференціювання в адипогенному напрямку, ніж інші досліджені нами типи клітин.

Підсумовуючи отримані дані, можна зробити висновок, що низька проліферативна активність, притаманна кріоконсервованим ММСК з кісткового мозку, поєднана з високою відносною кількістю клітин, які синтезують колаген I типу. В той же час ММСК із сухожилля і жирової тканини, збережені при аналогічних умовах кріоконсервування, виявляють більш високу здатність до проліферації та низьку відносну кількість клітин, які синтезують колаген I типу у порівнянні з ММСК кісткового мозку.

Незважаючи на те що дане дослідження не має прямого клінічного значення, його слід розглядати в якості однієї зі спроб визначення оптимального потенційного джерела для застосування ММСК в регенеративній медицині. Хоча в більшості випадків механізми, за допомогою яких трансплантовані клітини стимулюють регенерацію тканин, на даний момент залишаються недостатньо вивченими, результати даного дослідження вносять певний внесок в їх розуміння і можуть бути корисні у розробці терапевтичних стратегій для цілого ряду захворювань опорно-рухового апарату.

## ВИСНОВКИ

1. Кріоконсервовані культури клітин, що були отримані з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин, мали характерний для ММСК імунофенотип, високі показники цілісності мембрани, колонієутворення та проліферації, а також здатність до спрямованого адипогенного та хондрогенного диференціювання.
2. Проліферативна та колонієутворююча активність культур ММСК з кісткового мозку та жирової тканини після кріоконсервування була нижчою порівняно з сухожильною тканиною.
3. Кріоконсервовані ММСК кісткового мозку характеризувалися високим вмістом клітин, які синтезували колаген I типу, у порівнянні з культурами, що були отримані із сухожилля і жирової тканини.

## СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. [Text] / Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. // The International Society for Cellular Therapy position statement Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315-317.
2. Baksh D. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow [Text] / Baksh D., Yao R., Tuan R. // Stem cells. – 2007. – Vol. 25, № 4. – P. 1384-1392.
3. Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations: Comparison of Bone Marrow and Adipose Tissue [Text] / Busser H., Najjar M., Raicevic G., et al. // Stem cells and development. – 2015. – Vol. 24, № 18. – P. 2142-2157.



4. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane [Text] / *Díaz-Prado S., Muñíos-López E., Hermida-Gómez T., et al.* // J Cell Biochem. – 2010. – **Vol. 111, № 4.** – P. 846-857.
5. *Hegyí B.* Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall [Text] / *Hegyí B., Sági B., Kovacs J.* // Int Immunology. – 2010. – **Vol. 22, № 7.** – P. 551-559.
6. Сравнение способности к дифференцировке в ткани мезодермального происхождения мезенхимальных клеток человека, выделенных из разных источников [Текст] / *Суздальцев Ю. Г., Бурунова В. В., Вахрушев И. В., и др.* // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – **№ 1.** – С. 3-10.
7. *In vitro* characterization of stem/progenitor cells from semitendinosus and gracilis tendons as a possible new tool for cell-based therapy for tendon disorders [Text] / *Stanco D., Viganò M., Perucca C., et al.* // Joints. – 2014. – **Vol. 2, № 4.** – P. 159-168.
8. Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells [Text] / *Angelo P. C., Ferreira A. C., Fonseca V. D., et al.* // Genet Mol Res. – 2012. – **Vol. 11, № 2.** – P. 1002-1012.
9. Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells [Text] / *Rui Y. F., Lui P. P., Li G., et al.* // Tissue Eng Part A. – 2010. – **Vol. 16.** – P. 1549-1558.
10. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [Text] / *Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., et al.* // Science. – 1999. – **Vol. 284, № 2.** – P. 143-147.
11. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin [Text] / *Pogozhykh D., Prokopyuk V., Pogozhykh O., et al.* // PLoS One. – 2015 – **Vol. 2, № 10** – P. e0139834.
12. *Volk S. W.* Effects of donor characteristics and *ex vivo* expansion on canine mesenchymal stem cell properties: implications for msc-based therapies [Text] / *Volk S. W., Wang Y., Hankenson K. D.* // Cell Transplant. – 2012. – Vol. 21, № 10 – P. 2189-200. doi:10.3727/096368912X636821
13. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [Text] / *Hagmann S., Moradi B., Frank S., et al.* // BMC Musculoskelet Disord. – 2013 – **Vol. 14.** – P. 223.
14. *Giordano A.* From the laboratory bench to the patient's bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells [Text] / *Giordano A., Galderisi U., Marino I. R.* // Journal of Cellular Physiology. – 2007. – **Vol. 211, № 1.** – P. 27-35.
15. *Barry F. P.* Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization [Text] / *Barry F. P., Murphy J. M.* // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2004. – **Vol. 36, № 4.** – P. 568-584.
16. A phase I clinical trial of the treatment of crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation [Text] / *Garcia-Olmo D., Garcia-Arranz M., Herreros D., et al.* // Dis Colon Rectum. – 2005. – **Vol. 48, № 7.** – P. 1416-1423.
17. Проліферативно-дифференцировочний потенціал мультипотентних мезенхімальних стромальних кліток жирової ткани при культивуванні в присутстві тромбоцитарного лізату [Текст] / *Рогульська Е. Ю., Ревенко Е. Б., Петренко Ю. А., і др.* // Гени і клітки. – 2014. – **Т. 9, № 2.** – С. 63-67.
18. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation [Text] / *Gonda K., Shigeura T., Sato T., et al.* // Plast Reconstr Surg. – 2008. – **Vol. 121, № 2.** – P. 401-410.
19. *Адамс Р.* Методи культури кліток для біохіміків [Текст] / *Адамс Р.* // М.:Мир, 1983. – 264 с.
20. *Volkova N. A.* Cryopreservation effect on proliferation and differentiation potential of cultured chorion cells [Text] / *Volkova N. A., Goltsev A. N.* // CryoLetters. – 2015. – **Vol. 36, № 1.** – P. 25-29.
21. *Mossman T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [Text] / *Mossman T.* // J Immunol Methods. – 1983. – **Vol. 65.** – P. 55-63.
22. Isolation, culture and characterization of caprine mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid [Text] / *Pratheesh M. D., Gade N. E., Katiyar A. N., Dubey P. K. et al.* // Isolation Res Vet Sci. – 2013. – **Vol. 94.** – P. 313-319.
23. *Волкова Н. О.* Дослідження морфофункціональних характеристик кріоконсервованих культур клітин стромального походження [Текст] / *Волкова Н. О.* // Проблеми криобіології. – 2012. – **Т. 22, № 2.** – С. 118-125.
24. Aging of mesenchymal stem cells [Text] / *Sethe S., Scutt A., Stolzing A., et al.* // Ageing Res Rev. – 2006. – **Vol. 5, № 1.** – P. 91-116.
25. *Haack-Sørensen M.* Cryopreservation and Revival of Human Mesenchymal Stromal Cells. [Text] / *Haack-Sørensen M., Ekblond A., Kastrup J.* // Methods Mol Biol. – 2016. – **Vol. 1416.** – P. 357-374



СТАТТЯ НА САЙТІ  
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 04.10.2016 р.

Прийнята до друку 29.11.2016 р.

Робота проведена за підтримкою цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства», договір № 2.2.6.94.