

## Порівняльна оцінка морфофункціональних характеристик кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел

Д.Б. Введенський<sup>1,2</sup>, Н.О. Волкова<sup>1</sup>, А.М. Гольцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

<sup>2</sup>Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, м. Харків

## Comparative Evaluation of Morpho-Functional Characteristics of Cryopreserved Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Derived from Different Sources

D.B. Vvedenskyi<sup>1,2</sup>, N.O. Volkova<sup>1</sup>, A.M. Goltsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

<sup>2</sup>V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Виділення, культивування та кріоконсервування клітин мезенхімального походження є основою для отримання клітинного матеріалу, який використовується в регенеративній медицині для терапії патологій різного генезу. В роботі були проаналізовані морфофункціональні характеристики кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (кММСК) з хрящової та жирової тканин шурів.

Культури ММСК, отримані з жирової і хрящової тканини шурів, кріоконсервували під захистом 10% ДМСО і 20% фетальної бичачої сироватки зі швидкістю охолодження 1 град/хв до  $-80^{\circ}\text{C}$  та наступним зануренням у рідкий азот. Кріоампули відігрівали на водяній бані при температурі  $40^{\circ}\text{C}$  до появи рідкої фази. Для фенотипічного аналізу кММСК після заморожування-відігріву забарвлювали моноклональними антитілами CD45-FITC, CD44-FITC, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE («BD Biosciences», США) згідно з інструкцією фірми-виробника. Для спрямованого диференціювання досліджуваних культур в адіпо- та хондрогенному напрямках змінювали живильне середовище (на 15-ту добу культивування) на відповідне середовище диференціювання. Кількість диференційованих клітин в адіпогенному (Sudan IV) та хондрогенному (Toluidine blue) напрямках підраховували у світловому мікроскопі та визначали їх відсоток до загальної кількості клітин. Для статистичної обробки результатів використовували t-критерій Стьюдента та програму «Excel» («Microsoft», США).

Культури кММСК із жирової та хрящової тканин характеризувалися високим рівнем експресії CD44, CD73 CD90, CD105 ( $\geq 90\%$ ) та низьким рівнем експресії гемопоетичного маркера CD 45 ( $\leq 1\%$ ). Незалежно від джерела походження (жирова та хрящова тканини) кММСК зберігали здатність до адгезії, проліферації та спрямованого хондрогенного диференціювання ( $(69,5 \pm 5,8)\%$  та  $(78,2 \pm 8,5)\%$  відповідно). Слід зазначити, що культури кММСК із хрящової тканини мали нижчу здатність до спрямованого адіпогенного диференціювання ( $(28,9 \pm 4,8)\%$ ), ніж кММСК із жирової тканини ( $(62,7 \pm 5,3)\%$ ).

Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки методики застосування кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у клінічній практиці для лікування уражень тканин опорно-рухового апарату.

Отримання, культивування та кріоконсервування мезенхімальних стромальних клітин є базовими процедурами для отримання продуктів, що використовуються в регенеративній медицині для лікування багатьох захворювань. Морфологічні та функціональні характеристики кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (CrMMSC) отриманих з хрящової та жирової тканин були проаналізовані.

ММСК культури отримані з жирової та хрящової тканини шурів, кріоконсервували під захистом 10% ДМСО і 20% FBS з швидкістю охолодження  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  з наступним зануренням у рідкий азот. Відігрівання проводили у водній бані при температурі  $40^{\circ}\text{C}$  до появи рідкої фази. Для фенотипічного аналізу ММСК після заморожування та відігрівання забарвлювали моноклональними антитілами CD45-FITC, CD44-FITC, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE моноклональними антитілами (BD Biosciences, USA) згідно з інструкцією фірми-виробника. Для спрямованого диференціювання досліджуваних культур в адіпо- та хондрогенному напрямках змінювали живильне середовище (на 15-ту добу культивування) на відповідне середовище диференціювання. Кількість диференційованих клітин в адіпогенному (Sudan IV) та хондрогенному (Toluidine blue) напрямках підраховували у світловому мікроскопі та визначали їх відсоток до загальної кількості клітин. Для статистичної обробки результатів використовували t-тест за допомогою Excel.

Кріоконсервовані ММСК отримані з хрящової та жирової тканини шурів характеризувалися високим рівнем експресії CD44, CD90, CD105, CD73 ( $\geq 90\%$ ) та низьким рівнем експресії гемопоетичного маркера CD45 ( $\leq 1\%$ ). Незалежно від джерела походження (жирова та хрящова тканини) ММСК зберігали здатність до адгезії, проліферації та спрямованого хондрогенного диференціювання ( $(69,5 \pm 5,8\%)$  та  $(78,2 \pm 8,5\%)$  відповідно). Слід зазначити, що культури ММСК із хрящової тканини мали нижчу здатність до спрямованого адіпогенного диференціювання ( $(28,9 \pm 4,8\%)$ ), ніж ММСК із жирової тканини ( $(62,7 \pm 5,3\%)$ ).

Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки методики застосування кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у клінічній практиці для лікування уражень тканин опорно-рухового апарату.