

УДК 576.5.083:616.71-092.4

Н.О. Волкова^{1*}, Д.Б. Введенський^{1,2}, М.С. Юхта¹, А.М. Гольцев¹

Вплив кріоконсервування на фенотип і функціональні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел

UDC 576.5.083:616.71-092.4

N.O. Volkova^{1*}, D.B. Vvedensky^{1,2}, M.S. Yukhta¹, A.M. Goltsev¹

Influence of Cryopreservation on Phenotype and Functional Properties of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Derived From Different Sources

Ключові слова: кріоконсервування, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, апоптоз, фенотип, міграція.

Key words: cryopreservation, multipotent mesenchymal stromal cells, apoptosis, phenotype, migration.

Відновлення тканин опорно-рухового апарату є актуальним напрямком сучасної регенеративної медицини. Перспективним шляхом є залучення в медичну практику досягнень молекулярної та клітинної біології, зокрема застосування кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), отриманих із різних джерел [1–4]. Виділення, культивування та кріоконсервування клітин мезенхімального походження є основними етапами отримання клітинного матеріалу, який використовується в регенеративній медицині для терапії патологій різного генезу [5, 6]. Для забезпечення бази наших подальших досліджень та вибору кращого джерела клітин для терапії ушкоджень тканин опорно-рухового апарату було проаналізовано і порівняно морфофункціональні характеристики нативних і кріоконсервованих ММСК щурів, отриманих із хрящової та жирової тканин.

Мета роботи – порівняльна оцінка впливу кріоконсервування на фенотип і функціональні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел.

Експериментальні дослідження проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Restoration of the musculoskeletal system tissues is an important area of modern regenerative medicine. A promising way is to involve into medical practice the achievements of molecular and cell biology, in particular the use of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs), obtained from various sources [1–4]. Isolation, culturing and cryopreservation of cells of mesenchymal origin are the main stages of obtaining the cell material used in regenerative medicine to treat the pathologies of different genesis [5, 6]. To provide a basis for our further investigations and selection of the best source of cells for the treatment of musculoskeletal tissue damage, the morphofunctional characteristics of native and cryopreserved rat's MMSCs derived from cartilage and adipose tissue were analyzed and compared.

The research was aimed to comparatively assess the influence of cryopreservation on the phenotype and functional properties of multipotent mesenchymal stromal cells derived from different sources.

Experimental studies were performed in compliance with the requirements of humane treatment of experimental animals, regulated by the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of 21.02.2006) and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

² Кафедра хірургічних хвороб, Харківський Національний Університет ім. В.Н. Каразіна, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: volkovana781@gmail.com

Надійшла 01.09.2020

Прийнята до друку 31.08.2021

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

² Department of Surgical Diseases, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: volkovana781@gmail.com

Received September, 01, 2020

Accepted August, 31, 2021

Первинну суспензію клітин із жирової (ЖТ) та хрящової (ХТ) тканин шурув отримували з біоптатів шляхом ферментативної обробки [7]. Субкультивування проводили до досягнення моношару культурами ММСК ЖТ та ХТ з наступним їх кріоконсервуванням під захистом 10% ДМСО («ПанЕко», Росія) з додаванням 20% ембріональної сироватки. Швидкість охолодження складала 1°C/хв до -80°C із подальшим зануренням у рідкий азот [7]. Відігрів кріоконсервованих ММСК (КрММСК) здійснювали на водяній бані при 40°C до появи рідкої фази. Видалення кріопротектора проводили шляхом додавання розчину Хенкса («РАА», Австрія) у співвідношенні 1:9 з наступним центрифугуванням при 250g протягом 5 хв.

У ММСК із досліджених джерел до та після кріоконсервування вивчали фенотип (CD44-FITC, CD45-FITC, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE) та процеси апоптозу/некрозу (Annexin-V-FITC та 7-Amino-Actinomycin (7AAD)) на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD Biosciences», США) згідно з інструкцією фірми-виробника. Результати аналізували за допомогою програми «Win MDI v.2.8». Проліферативно-міграційний потенціал ММСК визначали за їх здатністю до заповнення дефекту моношару при культивуванні за методом Liang та співавт. [8] у нашій модифікації. Нативні та кріоконсервовані клітини у кількості $1,5 \times 10^3$ кл/см² висівали в 6-лункові планшети і культивували протягом 10 діб до утворення конфлюенту, після чого наносили дефект розміром $2 \times 0,1$ см. На 4 та 7-у доби визначали щільність клітин у зоні дефекту. Значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою критерію Манна-Уїтні з використанням програми «Statistika 8» (StatSoft Inc., США). Критичне значення рівня значущості приймалося рівним 0,05.

Аналіз отриманих результатів показав, що відносна кількість живих клітин Annexin V⁻/7AAD⁻ знижувалася після кріоконсервування: у випадку КрММСК ЖТ на 9,86%, КрММСК ХТ – на 7,91% порівняно з нативними ММСК із відповідних джерел (табл. 1). Відносна кількість клітин Annexin V⁺/7AAD⁻ (рання стадія апоптозу) в КрММСК ЖТ та ХТ значуще не відрізнялася від показників у нативних зразках. Показник Annexin V⁺/7AAD⁺ та Annexin V⁻/7AAD⁺ клітин (пізні стадії апоптозу, некроз) значуще збільшувався після кріоконсервування на 8,96% у випадку ММСК ЖТ та на 7,4% у випадку ММСК ХТ.

Таблиця 1. Цитофлуориметричний аналіз нативних і кріоконсервованих ММСК ЖТ та ХТ (% , M ± σ)

Table 1. Flow cytometry of native and cryopreserved AT and CT MMSCs (% , M ± σ)

Група Group	Annexin V ⁻ /7AAD ⁻	Annexin V ⁺ /7AAD ⁻	Annexin V ⁺ /7AAD ⁺ Annexin V ⁻ /7AAD ⁺
ММСК ЖТ AT MMSCs	81,21 ± 12,90	4,39 ± 1,57	14,40 ± 4,27
КрММСК ЖТ AT cMMSCs	71,35 ± 6,73*	5,29 ± 1,25	23,36 ± 3,22*
ММСК ХТ CT MMSCs	81,96 ± 4,32	5,32 ± 1,49	12,72 ± 4,12
КрММСК ХТ CT cMMSCs	74,08 ± 1,45	5,80 ± 1,75	20,12 ± 8,12*

Примітка: * – різниця значуща відносно нативних клітин ($p < 0,05$; $n = 5$).

Note: * – difference is significant relative to native cells ($p < 0,05$; $n = 5$).

Primary suspension of cells from rat's adipose (AT) and cartilage (CT) tissues was obtained from biopsies by enzymatic treatment [7]. Subculturing was performed until AT and CT MMSCs cultures reached the monolayer, followed by their cryopreservation under 10% DMSO protection (PanEco, Russia) with the addition of 20% fetal serum. The cooling rate was 1°C/min to -80°C with subsequent immersion into liquid nitrogen [7]. Cryopreserved MMSCs (crMMSCs) were heated in a water bath at 40°C until the appearance of the liquid phase. Removal of the cryoprotectant was performed by adding Hanks' solution (PAA, Austria) in a ratio of 1:9, followed by centrifugation at 250g for 5 minutes

The phenotype (CD44-FITC, CD45-FITC, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE) and apoptosis / necrosis (Annexin-V-FITC and 7-Amino-Actinomycin) were studied in MMSCs from the studied sources before and after cryopreservation (7AAD) with a flow cytometer 'FACS Calibur' ('BD Biosciences', USA) according to the manufacturer's instructions. The results were analyzed using the 'Win MDI v.2.8' software. The proliferation and migration potentials of MMSCs were determined by their ability to fill the monolayer defect when cultured by the method of Liang *et al.* [8] in our modification. Native and cryopreserved cells in the amount of 1.5×10^3 cells/cm² were seeded in 6-well plates and cultured for 10 days to form a confluent, after which a defect of 2×0.1 cm was applied. On days 4 and 7 the cell density in the defect area was examined. Significance of differences

Таблиця 2. Вплив криоконсервування на фенотип ММСК ЖТ та ХТ ($M \pm \sigma$)
Table 2. Influence of cryopreservation on phenotype of AT and CT MMSCs ($M \pm \sigma$)

Зразок Sample	Рівень експресії маркера, % Expression rate, %				
	CD 44	CD 45	CD 73	CD 90	CD 105
ММСК ЖТ AT MMSCs	93,4 ± 0,6	0,8 ± 0,3	90,7 ± 0,5	89,2 ± 0,9	95,1 ± 0,8
КрММСК ЖТ AT cMMSCs	82,3 ± 0,6*	0,6 ± 0,3	88,7 ± 0,7	85,4 ± 0,6	92,2 ± 0,3
ММСК ХТ CT MMSCs	96,1 ± 0,3	0,6 ± 0,1	89,5 ± 1,1	92,1 ± 0,7	94,4 ± 0,6
КрММСК ХТ CT cMMSCs	87,3 ± 0,5*	0,4 ± 0,1	87,5 ± 1,5	92,5 ± 0,4	92,6 ± 0,3

Примітка: * – різниця значуща відносно культивованих клітин ($p < 0,05$; $n = 5$).

Note: * – significant difference relative to cultured cells ($p < 0.05$; $n = 5$).

Досліджені нативні культури характеризувалися типовим для ММСК фенотипом із високим рівнем експресії ($\geq 90\%$) CD 44, CD 90, CD 73, CD 105 та низьким рівнем експресії ($\leq 1\%$) гемопоетичного маркера CD 45 (табл. 2).

Проте в зразках КрММСК ЖТ і ХТ спостерігали значуще зниження кількості CD 44⁺ клітин щодо нативних аналогів на 11,1 та 8,8% відповідно. Відомо, що маркер CD 44 відповідає за основні функції клітини, серед яких адгезія, хоумінг у периферичні

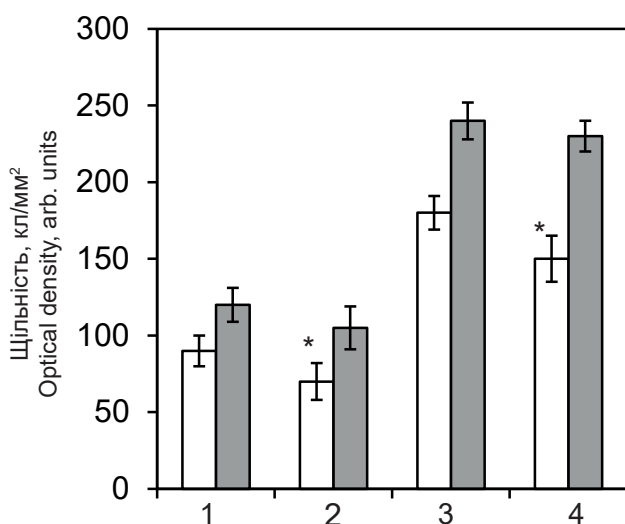
between the groups was assessed by the Mann-Whitney test using 'Statistics 8' software (StatSoft Inc., USA). The critical value of the significance level was assumed to be 0.05.

Analysis of the findings showed that the relative number of living cells Annexin V⁻ / 7AAD⁻ decreased after cryopreservation: in case of AT cMMSCs by 9.86%, CT cMMSCs – by 7.91% compared with native MMSCs from the relevant sources (Table 1). The relative number of Annexin V⁺/7AAD⁻ cells (early apoptosis stage) in AT and CT crMMSCs did not differ significantly from the values in native samples. The index of Annexin V⁺/7AAD⁺ and Annexin V⁻/7AAD⁺ cells (late stages of apoptosis, necrosis) increased significantly after cryopreservation with 8.96% for AT MMSCs and by 7.4% in the case of CT MMSCs.

The studied native cultures were characterized with a typical for MMSCs phenotype with a high expression rate ($\geq 90\%$) of CD 44, CD 90, CD 73, CD 105 and a low level of expression ($\leq 1\%$) of hematopoietic marker CD 45 (Table 2).

However, in the samples of AT and CT crMMSCs there was observed a significant decrease relative to native analogues of the number of CD 44⁺ cells by 11.1 and 8.8%, respectively. It is known that the CD 44 marker is responsible for the main functions of cell, including adhesion, homing of cells to peripheral and lymphoid organs and foci of inflammation, cell activation and increased production of cytokines and growth factors [2].

The results of determining the migratory activity of AT and CT MMSCs (Figure) showed a probable rise in cell density in the defect area during culturing



Вплив криоконсервування на міграційну активність ММСК ЖТ і ХТ: □ – 4 доба, ■ – 7 доба; * – різниця значуща відносно нативних клітин ($p < 0,05$; $n = 5$); 1 – ММСК ЖТ, 2 – КрММСК ЖТ, 3 – ММСК ХТ, 4 – КрММСК ХТ.

Influence of cryopreservation on migration activity of AT and CT MMSCs: □ – 4 days, ■ – 7 days; * – difference is significant relative to native cells ($p < 0.05$; $n = 5$); 1 – AT MMSCs, 2 – AT crMMSCs, 3 – CT MMSCs, 4 – CT crMMSCs.



та лімфоїдні органи та вогнища запалення, активація й збільшення продукції цитокінів і факторів росту [2].

Результати визначення міграційної активності ММСК ЖТ у ХТ (рисунок) свідчили про значуще збільшення щільності клітин в зоні дефекту при культивуванні ММСК ХТ відносно ММСК ЖТ на всіх строках спостереження.

На 4-у добу дослідження у КрММСК ЖТ та КрММСК ХТ спостерігали зниження щільності відносно нативних аналогів у 1,3 та 1,2 рази відповідно. Однак значущих відмінностей у міграційній активності на 7-у добу між нативними та кріоконсервованими ММСК із обох досліджених джерел не спостерігали.

Таким чином, проведене дослідження впливу низькотемпературного консервування на морфофункціональні характеристики культур ММСК, отриманих із жирової та хрящової тканин, показало, що їх кріоконсервування із застосуванням низької швидкості охолодження 1°C/хв до -80°C і середовища кріоконсервування (10% ДМСО та 20% ембріональної сироватки) не призводить до активізації процесів апоптозу, дозволяє зберегти фенотип і здатність до міграції. Однак при порівняльному аналізі цих характеристик було встановлено, що як нативним, так і кріоконсервованим ММСК ЖТ властивий низький міграційний потенціал відносно ММСК ХТ [4–5].

Результати проведеного дослідження можуть бути використані для створення кріобанку аутологічних стовбурових клітин стромального походження з можливістю їх подальшого раціонального застосування для потреб біотехнології та клітинної терапії ушкоджень опорно-рухового апарату.

Література

1. Chinnadurai R, Copland IB, Garcia MA. Cryopreserved mesenchymal stromal cells are susceptible to T-cell mediated apoptosis which is partly rescued by IFN γ licensing. *Stem Cells*. 2016; 34(9): 2429–42.
2. Haack-Sorensen M, Kastrup J. Cryopreservation and revival of mesenchymal stromal cells. *Methods Mol Biol*. 2011; 698(1): 161–74.
3. Jang TH, Park SC, Yang JH, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative medicine research*. 2017; 6(1): 12–8.
4. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015; 71(2): 181–97.

of CT MMSCs relative to AT MMSCs at all observation periods.

On day 4 of the study in AT and CT crMMSCs here was observed a decrease in cell density relative to native analogues by 1.3 and 1.2 times, respectively. However, no significant differences in the studied index on day 7 between native and cryopreserved MMSCs from both studied sources were observed.

Thus, a study of the effect of low-temperature preservation on morphofunctional characteristics of MMSC cultures derived from adipose and cartilage tissues showed that their cryopreservation using a low cooling rate of 1°C / min to -80°C and cryopreservation medium (10% DMSO and 20% embryonic serum) did not lead to apoptosis activation, allowed to preserve the phenotype and ability to migrate. However, when these characteristics were comparatively analyzed, it was found that both native and cryopreserved AT MMSCs had a low migration potential relative to CT MMSCs [4–5].

This study results can be used for establishing the cryobank of autologous stem cells of stromal origin with their further possible rational use for the needs of biotechnology and cell therapy in musculoskeletal injuries.

References

1. Chinnadurai R, Copland IB, Garcia MA. Cryopreserved mesenchymal stromal cells are susceptible to T-cell mediated apoptosis which is partly rescued by IFN γ licensing. *Stem Cells*. 2016; 34(9): 2429–42.
2. Haack-Sorensen M, Kastrup J. Cryopreservation and revival of mesenchymal stromal cells. *Methods Mol Biol*. 2011; 698(1): 161–74.
3. Jang TH, Park SC, Yang JH, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative medicine research*. 2017; 6(1): 12–8.
4. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015; 71(2): 181–97.
5. Peng L, Jia Z, Yin X, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev*. 2008; 17(4): 761–73.
6. Volkova N, Yukhta M, Goltsev A. Cryopreserved mesenchymal stem cells stimulate regeneration in an intervertebral disc. *Biomedicines*. 2015; 3(3): 237–47.
7. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Morphological and functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose tissue and tendons. *Cell and Organ Transplantation*. 2016; 4(2): 200–5.



5. Peng L, Jia Z, Yin X, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008; 17(4): 761–73.
6. Volkova N, Yukhta M, Goltsev A. Cryopreserved mesenchymal stem cells stimulate regeneration in an intervertebral disc. *Biomedicines.* 2015; 3(3): 237–47.
7. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Morphological and functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose tissue and tendons. *Cell and Organ Transplantation.* 2016; 4(2): 200–5.
8. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature protocols.* 2007. 2(2): 329–33.

