

УДК 616-089.843:612.419-018.4

В.В. Нікольська, Я.-М.О. Семенова*, Л.І. Тарануха, І.С. Нікольський

Культуральні властивості кріоконсервованих мультипотентних стромальних клітин тимуса і фетальних клітин шкірно-м'язового походження

UDC 616-089.843:612.419-018.4

V.V. Nikolska, Y.-M.O. Semenova*, L.I. Taranukha, I.S. Nikolsky

Cultural Properties of Cryopreserved Thymic Multipotent Stromal Cells and Fetal Skin- and Muscle-Derived Cells

Реферат: У роботі надано порівняльну характеристику властивостей мишиних кріоконсервованих шкірно-м'язових фетальних мультипотентних стромальних клітин (МСК) і МСК дорослого тимуса в культурі *in vitro*. У фетальних МСК спостерігається на 30% більша середня кількість подвоєнь за 24 години і на 41% менша середня тривалість подвоєнь. Встановлено, що фетальні МСК 4-го пасажу мають на 39% більшу клоногенну активність, ніж МСК дорослого тимуса. Фетальні МСК і МСК дорослого тимуса дорослої тварини диференціюються у спеціальних середовищах однаково ефективно за остео- і адипогенним напрямками. Фетальні МСК і МСК тимуса характеризуються практично однаковою високою здатністю до контактної взаємодії з тимоцитами, утворення фібробластолімфоцитарних розеток (ФЛР) і є значно менш активними у формуванні ФЛР із клітинами лімфатичних вузлів. Це свідчить про наявність у обох субпопуляцій МСК мембранної спорідненості до незрілих лімфоїдних клітин. Результати показали, що фетальні МСК помітно відрізняються від МСК дорослого тимуса дорослої тварини за активнішою кінетикою росту та клоногенним потенціалом, але обидві субпопуляції клітин мають практично однакову здатність до лінійного диференціювання і проявляють високу активність під час контактної взаємодії з незрілими лімфоїдними клітинами. Встановлено, що лінійне диференціювання і здатність до контактної взаємодії з лімфоцитами є достатньо стабільними властивостями МСК, а проліферативна активність і колонієутворення *in vitro* суттєво відрізняються у різних типів МСК, що може бути враховано під час вибору клітин для терапії, досліджень і оцінки їх результатів.

Ключові слова: кріоконсервування, мультипотентні стромальні клітини тимуса, фетальні шкірно-м'язові мультипотентні стромальні клітини, культуральні властивості.

Abstract: The paper provides a comparison of properties of cryopreserved fetal murine multipotent stromal cells (MSCs) of skin-muscular origin and those derived from adult thymus in culture *in vitro*. Fetal MSCs showed a 30% higher number of average population doublings within 24 hrs, and 41% lower average population doubling time. It was found that the fetal MSCs of the 4th passage had a 39% higher clonogenic activity than the adult thymus-derived ones. Fetal MSCs and those derived from adult thymus differentiated in osteogenic and adipogenic lineages with equal efficiency in special culture media. Fetal and thymus-derived MSCs were characterized by almost the same high ability of contact interaction with thymocytes, and the fibroblast-lymphocyte rosette (FLR) formation. They were far less active in FLR formation with lymph node cells. This indicated the presence of membrane affinity for immature lymphoid cells in both MSC subpopulations. The results showed the fetal MSCs to be significantly different from the adult thymus-derived MSCs by more active kinetics of growth and clonogenic potential. However, both cell subpopulations had virtually the same ability for linear differentiation and showed high activity during contact with immature lymphoid cells. Linear differentiation and the ability to interact with lymphocytes were found to be quite stable properties of MSCs, but a proliferative activity and *in vitro* colony formation distinguished significantly in different types of MSCs. This can be taken into account when choosing the cells for therapy, research and results assessment.

Key words: cryopreservation, thymic multipotent stromal cells, fetal skin- and muscle-derived multipotent stromal cells, cultural properties.

Вивчення імунобіологічної активності мультипотентних стромальних клітин (МСК) є одним із провідних наукових напрямків щодо підвищення активності регенерації імунної системи. Перспективність таких досліджень обґрунтовується даними про велике значення МСК у імунопоезі, підтримці гемопоетичних стовбурових клітин та їх нащадків у кістковому мозку

The study of immunobiological activity of multipotent stromal cells (MSCs) is among the research priorities in science to increase the activity of immune system regeneration. This research prospects are evidenced by MSCs importance in immunopoiesis, maintenance of hematopoietic stem cells and their progeny in bone marrow and thymus, as well as more mature lymphocytes at the peri-

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Вишгородська, 67, м. Київ, Україна 04114;
тел.: (+38 044) 46-87-550
електронна пошта: amn_igrm@ukr.net

Надійшла 12.07.2019
Прийнята до друку 31.08.2021

Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

*To whom correspondence should be addressed:

67, Vyshhorodska str., Kyiv, Ukraine 04114;
tel.: +380 44 46 87 550
e-mail: amn_igrm@ukr.net

Received July, 12, 2019
Accepted August, 31, 2021

© 2021 V.V. Nikolska, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

та тимусі, а також більш зрілих лімфоцитів на периферії [6]. Результати багатьох досліджень свідчать про участь МСК у реалізації імунологічних реакцій [13, 16, 18].

На сьогодні клітинна трансплантація широко впроваджується у клінічну практику. Значною мірою цьому сприяють розроблені в Інституті проблем кріобіології і кріомедицині НАН України (м. Харків) методи кріоконсервування стовбурових клітин, які дозволяють накопичувати і зберігати матеріал без втрат життєздатності й функціональної активності клітин [2, 5, 10]. Часто проводяться дослідження з МСК різних тканин, хоча залежність властивостей МСК від їх походження не завжди з'ясована. Деякі розбіжності (часто протилежні) в оцінці імунорегенеративної та імунологічної активності МСК можуть бути обумовлені саме застосуванням МСК різного походження. Втім спроби порівняти властивості МСК із різних тканин у стандартизованих експериментах у межах однієї роботи зустрічаються нечасто. У більшості робіт дослідники зосереджують увагу на вивченні якоїсь однієї субпопуляції МСК.

Відомо, що найбільш характерні для МСК властивості (проліферативна і колонієутворююча активність, лінійне диференціювання, а також здатність до контактної міжклітинної взаємодії) краще проявляються в культурі *in vitro* [14]. З урахуванням зазначених даних і їх актуальності для розвитку клітинної терапії та імунології у роботі досліджені МСК тимуса і шкірно-м'язові фетальні МСК мишей, функціональна активність яких спрямована на підтримку в організмі різних за гістогенезом клітин. Результати транскриптомного аналізу показали, що шкірно-м'язові МСК експресують підвищену кількість генів, які підтримують епітеліальні клітини, сприяють їх адгезії до базальної мембрани та є відповідальними за мезенхімально-епітеліальні перехресні сигнали. Натомість МСК тимуса експресують гени, які відповідають за індукцію взаємодії з гематолімфоцитарними елементами і епітеліальними клітинами у мікрооточенні з високим ступенем апоптозу [19]. Таким чином, транскриптомний аналіз пояснює, чому МСК тимуса необхідні для тимусного органогенезу, підтримки тимоцитів і тимічного епітелію, а шкірно-м'язові МСК сприяють формуванню бар'єрних органів імунної системи.

Мета роботи – порівняльна характеристика властивостей кріоконсервованих мультипотентних стромальних клітин тимуса дорослої тварини і фетальних шкірно-м'язових клітин у культурі *in vitro*.

phery [14]. The MSCs involvement in immune responses has been confirmed by many researches [2, 10, 12].

To date, the cell transplantation is widely enrolled into clinical practice. This have been greatly facilitated by the techniques for stem cell cryopreservation designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv), enabling the material accumulation and storage with no loss of cell viability and functional activity [5, 8, 18].

The studies of MSCs, derived from different tissues are frequent, although the dependence of MSCs features on their origin is not always elucidated. Some results of MSCs immune-regenerative and immunological activity evaluation are often opposite, and may be due to the use of MSCs of different origins. However, the attempts to compare the properties of MSCs derived from different tissues during standardized experiment performance within one research, are rare. In most researches, the scientists are focused on studying a single subpopulation of MSCs.

The most specific properties of MSCs (proliferative and colony-forming activity, linear differentiation, as well as the ability to a contact cell-to-cell interaction) are known to be more pronounced in culture *in vitro* [3]. Taking into account these data and their relevance for cell therapy and immunology development, we have studied here the murine thymic MSCs and fetal skin-muscular ones, the functional activity of which maintain cells of different histogenesis in the body. The results of transcriptomic analysis showed the skin-muscular MSCs to express an increased number of genes, supporting epithelial cells, promoting their adhesion to basal membrane and to be responsible for mesenchymal-epithelial cross-signals. Instead, the thymic MSCs express the genes responsible for induction of interaction with hematolymphoid elements and epithelial cells in microenvironment with a high-level apoptosis [17]. Thus, the transcriptome analysis explains why the thymus-derived MSCs are necessary for thymic organogenesis, support of thymocytes and thymic epithelium, whereas the skin- and muscle-derived MSCs ensure the formation of barrier organs of immune system.

The purpose herein was to comparatively characterize the properties of cryopreserved thymic multipotent stromal cells and fetal skin- and muscle-derived ones in culture *in vitro*.

Material and methods

The thymi of C57BL male mice of 6–8 weeks old, obtained from the breeding nursery of R. Ye. Ka-



Матеріал та методи

Як джерело МСК тимуса використовували тимуси самців мишей лінії C57BL віком 6–8 тижнів із розплідника Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України (м. Київ). Миші отримували збалансоване харчування та мали вільний доступ до води. Усі роботи з експериментальними тваринами виконувалися з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Евтаназію тварин здійснювали методом цервікальної дислокації під ефірним наркозом.

Фетальні шкірно-м'язові МСК ізолювали за методом механічно-ферментативного дезагрегування тканини 14-денних плодів мишей лінії C57BL [12]. Фрагменти шкірно-м'язової тканини плодів подрібнювали та заливали 0,25%-м розчином трипсину, інкубували протягом 15 хв при 37°C та безперервному перемішуванні. Після відмивання клітини ресуспендували та переносили в культуральні флакони. Первинні культури фетальних МСК культивували 10–14 діб. Через кожні 3–4 доби половину середовища замінювали на свіже. Після досягнення конfluентності проводили 1-й пасаж ($8 \times 10^3/\text{cm}^2$). Наступні 4 пасажі здійснювали через 4 доби з використанням для пересіву такої ж кількості клітин.

Культуру стромальних клітин тимуса отримували методом експлантатів за стандартною методикою [20]. Тканину тимуса подрібнювали скальпелем на мікрофрагменти розміром 1–2 мм³, 2–3 рази відмивали від тимоцитів розчином Хенкса та переносили в культуральні флакони. Прикріплені експлантати видаляли із культури механічним шляхом через 7–10 діб. Через 5–7 діб з'являлися кластери і колонії фібробластоподібних клітин. Первинні культури МСК тимуса культивували 10–14 діб. Через кожні 3–4 доби половину середовища замінювали на свіже. Під час формування численних фібробластних колоній проводили 1-й пасаж ($8 \times 10^3/\text{cm}^2$). Наступні 4 пасажі здійснювали через 5 діб із використанням для пересіву такої ж кількості клітин.

Культиування проводили у поживному середовищі DMEM/F12 («Sigma», США) у співвідношенні 1:1 з додаванням 10%-ї ембріональної телячої сироватки («Sigma»), 10 мМ L-глутаміну («Sigma»), 100 МО/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину («Дарниця», Україна) в CO₂-інкубаторі («Jouan», Франція) за температури 37°C і

vetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine (Kyiv), were used as a source of thymic MSCs. Mice had a balanced diet and free access to water. All the manipulations with experimental animals were carried out in compliance with the requirements of the Article 26 of the Law of Ukraine 'On Protection of Animals Against Cruelty' (February 21, 2006) and 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986). Animals were sacrificed by cervical dislocation under ether anesthesia.

Fetal skin-muscular MSCs were isolated by mechanical and enzymatic tissue disaggregation of 14-day-old C57BL murine fetuses [4]. Fragments of skin-muscular tissue were dissected and filled with 0.25% trypsin solution, incubated for 15 min at 37°C with continuous stirring. After washing, the cells were resuspended and transferred into culture vials. Primary cultures of fetal MSCs were cultured for 10–14 days. Every 3–4 days, half of the medium was replaced with fresh one. With achievement of confluence, the 1st passage ($8 \times 10^3/\text{cm}^2$) was performed. The next 4 passages were done 4 days later using the same cell number for reseeding. The thymic stromal cell culture was obtained using the explant method according to the standard technique [19]. Thymus tissue was cut with a scalpel into 1–2 mm³ microfragments, washed 2–3 times from thymocytes with Hanks' solution and transferred into culture vials. Attached explants were mechanically removed from the culture after 7–10 days. In 5–7 days, the clusters and colonies of fibroblast-like cells appeared. Primary cultures of thymic MSCs were cultured for 10–14 days. Every 3–4 days, half of the medium was replaced with fresh one. The 1st passage ($8 \times 10^3 / \text{cm}^2$) was carried out when numerous fibroblast colonies were formed. The next 4 passages were done after 5 days using the same cell number for reseeding.

Cells were cultured in 1:1 ratio in nutrient medium DMEM / F12 (Sigma), supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma), 10 mm L-glutamine (Sigma) and 100 IU / ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Darnytsia, Ukraine) in a CO₂ incubator (Jouan, France) at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. Cells were subcultured in 1:3 ratio using a mixture of 0.05% trypsin (Biotestmed, Ukraine) and 0.02% EDTA (Sigma) solutions.

Both cell types of 4 passages were accumulated and stored by cryopreservation in three stages using the controlled rate freezer 'KRYO 560-16' (Planer, UK) and DMSO at 5% final concentration. Afterwards, the vials with cells were immersed into liquid nitrogen [8].



5%-й атмосфері CO₂. Субкультивування клітин у співвідношенні 1:3 проводили з використанням суміші розчинів 0,05%-го трипсину («Біотестмед», Україна) та 0,02% ЕДТА («Sigma»).

Клітини 4-х пасажів обох типів накопичували і зберігали кріоконсервуванням у три етапи з використанням програмного заморожувача «KRYO 560-16» («Planer», Велика Британія) і ДМСО в кінцевій концентрації 5%. Після цього пробірки з клітинами занурювали у рідкий азот [5].

Безпосередньо перед застосуванням зразки розморожували за температури (40 ± 0,5)°C протягом 2,5 хв до появи в кріопробірці рідкої фази. Після повного розморожування клітини відмивали від кріопротектора шляхом центрифугування при 250g протягом 5 хв із подальшим ресуспендуванням у поживному середовищі.

Кількість подвоєнь популяції підраховували за формулою [15]:

$$PD = 3,32 \times \log \frac{N}{N_0},$$

де N₀ і N – початкова і кінцева кількість клітин.

Тривалість подвоєння популяції розраховували за формулою [1]:

$$PDT = \frac{t_2 - t_1}{3,32 \times \log \frac{N}{N_0}},$$

де (t₂ - t₁) – час між пасажами, N₀ і N – початкова і кінцева кількість клітин.

Процес колонієутворення вивчали шляхом посіву 2 × 10² на чашку Петрі (діаметр 100 мм, «Costar», США) в поживному середовищі, яке містило DMEM/F12 з додаванням 10%-ї ЕТС, 10 мМ L-глутаміну та по 100 МО/мл пеніциліну та стрептоміцину. Клітини культивували в CO₂-інкубаторі при 37°C і 5%-й атмосфері CO₂ протягом 14 діб. Надалі колонії забарвлювали кристалічним фіолетовим та підраховували за допомогою інвертованого мікроскопа «Axiovert 40C» («Zeiss», Німеччина) [12].

Ефективність клонування МСК розраховували за формулою [9]:

$$\text{Ефективність клонування} = \left(\frac{\text{кількість колоній}}{\text{кількість посіяних клітин}} \right) \times 100\%.$$

Лінійне диференціювання за остеогенним або адипогенним напрямками вивчали за методиками С. А. Gregory та співавт. [15] та W. K. Kim та співавт. [17].

Для визначення мембранної спорідненості МСК і лімфоїдних клітин використовували ре-

Immediately before use, the samples were thawed at (40 ± 0.5)°C for 2.5 min up to the liquid phase appearance in a cryotube. After complete thawing, the cells were washed from cryoprotectant using centrifugation at 250g for 5 min, followed by resuspension in nutrient medium.

The number of population doublings was calculated by the formula [15]:

$$PD = 3,32 \times \log \frac{N}{N_0},$$

where N₀ and N are the initial and final cell numbers.

Population doubling time was calculated by the formula [1]:

$$PDT = \frac{t_2 - t_1}{3,32 \times \log \frac{N}{N_0}},$$

where (t₂ - t₁) is the time between passages, N₀ and N are the initial and final cell numbers.

The colony formation was studied by inoculating 2 × 10² cells per Petri dish (100 mm diameter, Costar, USA) in a nutrient medium containing DMEM / F12, supplemented with 10% FBS, 10 mM L-glutamine and 100 IU / ml penicillin and streptomycin. Cells were cultured in a CO₂ incubator at 37°C and 5% CO₂ for 14 days. Further the colonies were stained with crystal violet and counted using an inverted microscope 'Axiovert 40C' (Zeiss, Germany) [4].

The cloning efficiency of MSCs was calculated by the formula [16].

$$\text{Cloning efficiency} = \left(\frac{\text{number of colonies}}{\text{number of seeded cells}} \right) \times 100\%$$

Osteogenic or adipogenic differentiations were studied by the methods of C.A. Gregory *et al.* [7] and W.K. Kim *et al.* [11].

The membrane affinity of MSCs and lymphoid cells was assessed using the fibroblast-lymphocyte rosettes (FLR) formation by the following procedure. The microtube was filled with 1 × 10⁴ of frozen-thawed MSCs (in 0.1 ml), then supplemented either with 1 × 10⁶ thymocytes or lymph node cells (in 0.1 ml). The stirred cell suspension was centrifuged at 250g for 5 min. The precipitate was immediately resuspended by pipetting in a 0.1 ml volume. To stain MSCs, a drop of suspension was applied to the neutral red-covered glass slide. The suspension was then transferred into Goryaev's counting chamber, where the FLR number was counted. A cell grouping, consisting of MSCs and three or more lymphocytes attached to it, was assumed as a rosette [15].



акцію утворення фібробластолімфоцитарних розеток (ФЛР) за наступною процедурою. У мікропробірку вносили 1×10^4 розморожених МСК (у 0,1 мл), додавали 1×10^6 тимоцитів або клітин лімфатичних вузлів (у 0,1 мл). Перемішану суспензію клітин центрифугували при 250g протягом 5 хв. Осад негайно ресуспендували піпетуванням в об'ємі 0,1 мл. Для забарвлення МСК краплю суспензії наносили на покриті нейтральним червоним предметне скло. Потім суспензію переносили в камеру Горяєва, у якій підраховували кількість ФЛР. За розетку вважали клітинне угруповання, яке складається з МСК і приєднаних до неї трьох і більше лімфоцитів [7].

Одержані результати опрацьовували з використанням програми «Statistica 8.0» («StatSoft», США). Для визначення відмінностей між досліджуваними групами використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні (U) [4]. Усі дані на діаграмах представлені як медіана, 25 та 75%-й проценти, мінімальне та максимальне значення [11]. Під час інтерпретації результатів критичною величиною рівня значущості вважали $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Життєздатність фетальних МСК 4-го пасажу до кріоконсервування дорівнювала 83,4 (76,1–93,4) %, а після – 85,8 (79,3–94,5) %, $n = 6$ ($p > 0,05$). Життєздатність МСК тимуса 4-го пасажу до кріоконсервування складала 82,9 (75,9–90,3) %, а після – 84,7 (77,5–92,3) %, $n = 6$ ($p > 0,05$). Це свідчить, що кріоконсервування практично не впливало на життєздатність обох типів МСК.

Як можна побачити з рис. 1, кінетика росту фетальних МСК була активнішою, ніж МСК тимуса дорослих тварин. Кількість подвоєнь фетальних МСК була на 30% більшою, а тривалість подвоєнь у популяції цих клітин – на 46% меншою.

Фетальні МСК 4-го пасажу утворювали на 39% більше фібробластних колоній, ніж МСК тимуса (рис. 2), що свідчить про їх більший клоногенний потенціал.

Фетальні МСК і МСК тимуса, культивовані в остеогенному чи адипогенному середовищі, добре забарвлювалися алізариним червоним і масляним червоним відповідно, на відміну від культивованих у звичайному поживному середовищі клітин, що свідчить про ефективні процеси остеогенного та адипогенного диференціювання (рис. 3). Фетальні МСК і МСК тимуса дорослої тварини диференціювалися за остеогенним і адипогенним напрямками практично однаково ефективно.

Для визначення мембранної спорідненості використовували реакцію утворення ФЛР. На

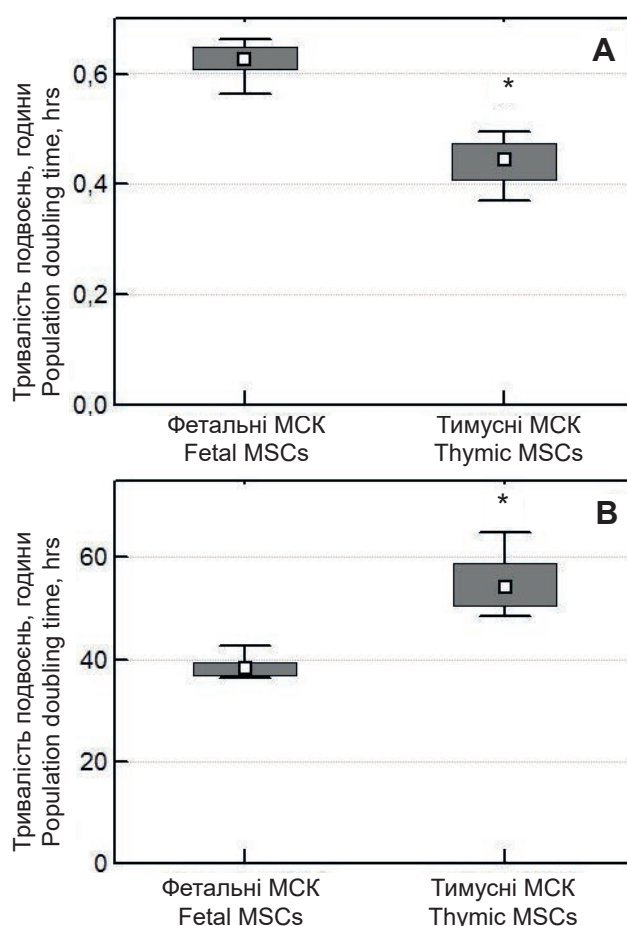


Рис. 1. Кількість (А) і тривалість (В) подвоєнь популяції в культурах фетальних та тимусних МСК протягом 1–4 пасажів. Різниця значуща по відношенню до фетальних МСК (*), $p \leq 0,05$.

Fig. 1. Number (A) and time (B) of population doublings in cultures of fetal and thymic MSCs for 1–4 passages. Differences are significant if compared with fetal MSCs (*), $p \leq 0.05$.

Our findings were processed using the Statistica 8.0 software (StatSoft, USA). The nonparametric Mann-Whitney U test was used to determine the differences between the studied groups [9]. All the data in diagrams are presented as the median, the 25th and 75th percentiles, minimum and maximum value [20]. The $p < 0.05$ was considered as critical value of significance level during results interpreting.

Results and discussion

The viability of fetal MSCs of the 4th passage prior to and after cryopreservation was 83.4 (76.1–93.4) and 85.8 (79.3–94.5)%, $n = 6$ ($p > 0.05$), respectively. The viability of thymic MSCs of the 4th passage prior to and after cryopreservation was 82.9 (75.9–90.3) and 84.7 (77.5–92.3)%, $n = 6$ ($p > 0.05$), respectively, thus suggesting the cryopreservation to have virtually no effect on the viability of both types of MSCs.



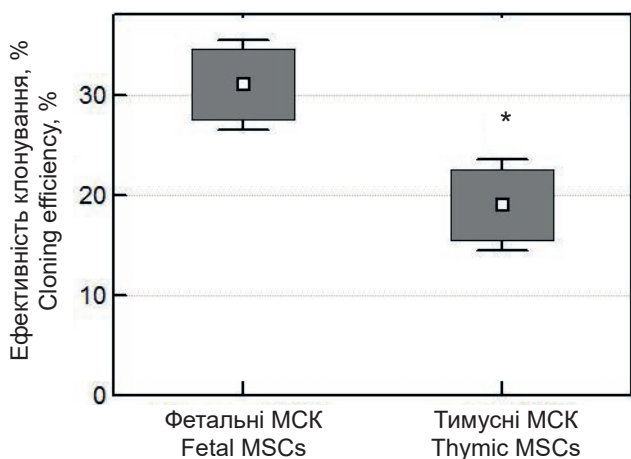


Рис. 2. Ефективність клонування фетальних та тимусних МСК 4-го пасажу. Різниця значуща по відношенню до фетальних МСК (*), $p \leq 0,05$.

Fig. 2. Cloning efficiency of fetal and thymic MSCs of the 4th passage. Differences are significant if compared with fetal MSCs (*), $p \leq 0.05$.

рис. 4 представлено ФЛР, утворені МСК тимуса та тимоцитами.

Результати вивчення здатності фетальних МСК і МСК тимуса до кооперації з лімфоцитами показали, що МСК різного походження утворювали приблизно однакову кількість ФЛР (рис. 5). Фетальні МСК і МСК тимуса проявляють більшу активність у взаємодії з тимоцитами порівняно з клітинами лімфатичних вузлів. У роботі А.М. Гольцева та співавт. [3] на моделі ревматоїдного артриту продемонстровано здатність нативних і кріоконсервованих клітин ембріональної печінки до корекції механізмів розвитку ад'ювантного артриту, залежних від кооперативних взаємодій в імунній системі. Ймовірно, активна

The Fig. 1 shows the kinetics of growth to be significantly more active in fetal MSCs vs. the adult thymus-derived ones. The number of population doublings of fetal MSCs was 30% higher, but the population doubling time was 46% shorter in these cells.

Fetal MSCs of the 4th passage formed 39% more fibroblast colonies than thymic ones (Fig. 2), thereby testifying to their higher clonogenic potential.

Fetal and thymic MSCs cultured in either osteogenic or adipogenic medium were well stained with alizarin red and oil red, respectively, in contrast to cells cultured in normal nutrient medium, thus testifying to efficient osteogenic and adipogenic differentiations (Fig. 3). Fetal MSCs and adult thymus-derived ones were differentiated by osteogenic and adipogenic lineages with roughly the same effectiveness.

The FLR formation was used to determine the membrane affinity. The Fig. 4 shows the FLR, formed by thymic MSCs and thymocytes.

The results of study of fetal and thymic MSCs ability to cooperate with lymphocytes showed the MSCs of different origin to form FLR in approximately the same amount (Fig. 5). Fetal MSCs and thymic ones were more active in interaction with thymocytes, as compared with lymph node cells. A.M. Goltsev *et al.* [6] in the model of rheumatoid arthritis have demonstrated the ability of native and cryopreserved embryonic liver cells to correct the mechanisms of adjuvant arthritis development, dependent on cooperative interactions in the immune system. The active contact interaction of MSCs, in particular fetal ones, with lymphocytes could probably be one of the impact

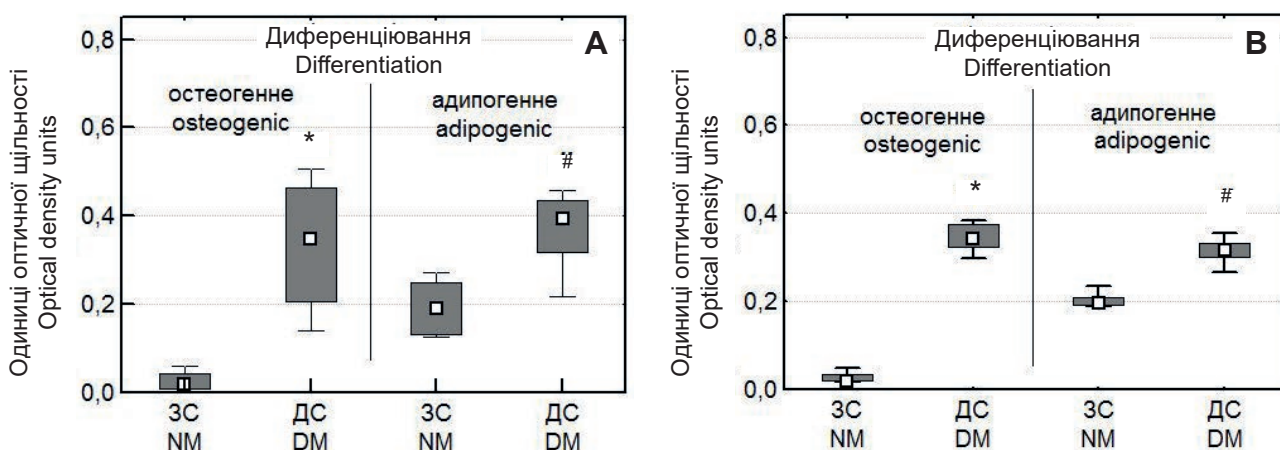


Рис. 3. Диференціювання фетальних (А) і тимусних (В) МСК за остеогенним та адипогенним напрямками; ЗС – звичайне середовище, ДС – диференціувальне середовище. Різниця значуща по відношенню до звичайного середовища (* – $p \leq 0,05$ для остеогенного диференціювання, # – $p \leq 0,05$ для адипогенного диференціювання).

Fig. 3. Differentiation of fetal (A) and thymic (B) MSCs by osteogenic and adipogenic lineages. NM – normal medium, DM – differentiation medium. Differences are significant if compared with normal medium (* – $p \leq 0.05$ for osteogenic differentiation, # – $p \leq 0.05$ for adipogenic differentiation).



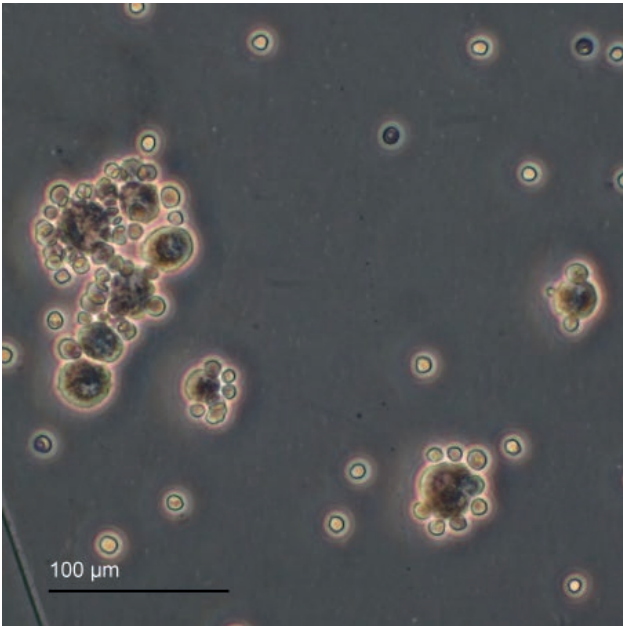


Рис. 4. Фібробластолімфоцитарні розетки, утворені МСК тимуса і тимоцитами. Фазовий контраст.

Fig. 4. Fibroblast-lymphocyte rosettes formed by thymic MSCs and thymocytes. Phase contrast.

контактна взаємодія МСК, зокрема фетальних, із лімфоцитами може бути одним із механізмів впливу стромальних і лімфоїдних клітин на розвиток аутоімунних процесів.

Таким чином, дослідження дорослих (тимуса) і фетальних (шкірно-м'язові) МСК виявило, що в цілому обидва типи клітин мають подібні (однакову ефективність до лінійного диференціювання, а також до контактної взаємодії з лімфоїдними клітинами) і відмінні (різну кінетику росту *in vitro* і клонісню активність) властивості.

Відомо, що у процесі ембріонального розвитку МСК генеруються мезенхімою, яка, у свою чергу, трансформується із мезодерми, і становлять гомогенну популяцію. Осторонь знаходяться МСК тимуса, які походять із нейрального гребінця [21]. Далі ембріональні МСК розселяються у певні тканинні ніші, підпадають під вплив специфічних факторів і диференціюються відповідно до умов функціонування. Так, дослідження декількох субпопуляцій МСК із різних фетальних, перинатальних джерел і тканин дорослих тварин показало значні відмінності між ними за потенціалом самооновлення, часом подвоєння популяцій і колонієформуючою активністю.

Однак у літературних джерелах практично не представлені дані, які характеризували відповідну активність шкірно-м'язових МСК і МСК тимуса, за виключенням попередніх наших досліджень щодо властивостей МСК тимуса. Резуль-

mechanisms of stromal and lymphoid cells on autoimmune processes development.

Thus, both cell types were found to show the similar features such as the same efficiency to linear differentiation, and to contact interaction with lymphoid cells and the distinct ones, namely different *in vitro* growth kinetics and clonogenic activity.

The MSCs are known to be generated by mesenchyme during embryonic development, which, in turn, is transformed from mesoderm, and constitute a homogeneous population. Aside are the thymic MSCs, which originate from the neural crest [21]. Subsequently, the embryonic MSCs are settled in certain tissue niches, being affected by specific factors and differentiated according to functioning conditions. For example, the study of several subpopulations of MSCs derived from different fetal, perinatal sources and tissues of adult animals showed significant differences between them by

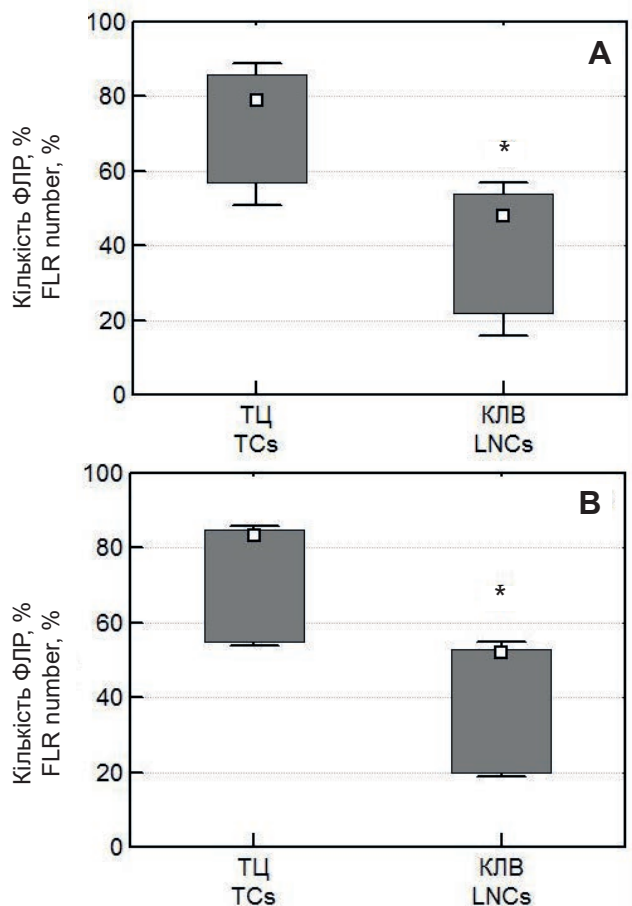


Рис. 5. Кількість фібробластолімфоцитарних розеток, які утворені фетальними (А) і тимусними (Б) МСК із тимоцитами (ТЦ) та клітинами лімфатичних вузлів (КЛВ). Різниця значуща по відношенню до тимоцитів (*), $p \leq 0,05$.

Fig. 5. Number of fibroblast-lymphocyte rosettes formed by fetal (A) and thymic (B) MSCs with thymocytes (TCs) and lymph node cells (LNCs). Differences are significant if compared with thymocytes (*), $p \leq 0.05$.

тати проведених досліджень показали здатність кріоконсервованих клітин до збереження життєздатності й утворення ФЛР [8]. Нами було підтверджено наявні та отримано нові дані щодо фетально-м'язових МСК. Результати нашої роботи подібні до даних, отриманих щодо МСК фетального походження у роботі С. Brown та співавт. [14]. У зв'язку з цим досліджені клітини є перспективними для подальшого вивчення і застосування у клітинній терапії.

Висновки

Кріоконсервування обох типів МСК за методикою Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України практично не впливає на життєздатність клітин. Фетальні МСК 4-го пасажу мають значно більшу (на 39%) клоногенну активність, ніж МСК дорослого тимуса.

Кінетика росту мишиних кріоконсервованих шкірно-м'язових фетальних МСК суттєво активніша, ніж у кріоконсервованих МСК дорослого тимуса. У фетальних МСК спостерігається більша середня кількість подвоєнь клітин за 24 години на 30% і відповідно менша середня тривалість подвоєнь на 41%.

Фетальні МСК і МСК дорослого тимуса мають практично однакову високу активність у контактній взаємодії з тимоцитами, що проявляється формуванням ФЛР. Клітини обох типів менш активні у формуванні ФЛР із клітинами лімфатичних вузлів, що свідчить про більшу здатність вивчених МСК до контактної взаємодії з незрілими лімфоцитами *in vitro*.

Отримані дані свідчать, що кріоконсервовані фетальні МСК значно відрізняються від кріоконсервованих МСК дорослого тимуса за кінетикою росту, клоногенним потенціалом і мають практично однакову здатність до диференціювання за остео- і адипогенним напрямком, а також до формування ФЛР із лімфоїдними клітинами.

potential for self-renewal, population doubling time and colony-forming activity.

Very few publications can be found, describing the corresponding activity of skin-muscular and thymic MSCs, excepting our previous study of properties of thymic MSCs performed. These findings showed the ability of cryopreserved cells for viability preservation and FLR formation [13]. Here, we have confirmed the available data on skin-muscular MSCs and presented the new ones. Our findings are consistent with those, obtained for MSCs of fetal origin reported by C. Brown *et al.* [3]. Therefore, the studied cells emerge to be promising for further study and application in cell therapy.

Conclusions

Cryopreservation of both MSCs types using the technique designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine had virtually no effect on cell viability. A clonogenic activity of fetal MSCs of the 4th passage was significantly higher (by 39%) vs. the adult thymus-derived ones.

The growth kinetics of cryopreserved murine fetal skin- and muscle-derived MSCs was significantly more active as compared with the cryopreserved adult thymus-derived ones. Fetal MSCs demonstrated a 30% higher average number of population doublings within 24 hrs and a 41% shorter average population doubling time.

Fetal MSCs and adult thymus-derived ones had almost equal high activity in contact interaction with thymocytes, manifested by FLR formation. Cells of both types were less active in FLR formation with lymph node cells, thus indicated a higher ability of the studied MSCs for contact interaction with immature lymphocytes *in vitro*.

Our findings showed the cryopreserved fetal MSCs to significantly differ from the cryopreserved adult thymus-derived ones by growth kinetics, clonogenic potential and to have almost the same ability to differentiate by osteo- and adipogenic lineages, as well as to form the FLR with lymphoid cells.

Література

1. Айзенштадт АА, Сказина МА, Котелевская ЕА, и др. Характеристики мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека при длительном культивировании *in vitro*. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова. 2018; 10(1): 11–9.
2. Гольцев АН, Дубрава ТГ, Козлова ЮА, и др. Исследование терапевтического эффекта трансфузии кріоконсервированных стволовых кровяных клеток из разных источников при лечении экспериментального адьювантного артрита. Трансплантология. 2007; 9(1): 28–30.

References

1. Aizenshtadt AA, Skazina MA, Kotelevskaya EA, et al. Characterization of umbilical cord mesenchymal stromal cells during long-term expansion *in vitro*. Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 2018;10(1):11–19. Russian.



3. Гольцев АН, Рассоха ИВ, Луценко ЕД, и др. Межклеточные взаимодействия в иммунокомпетентной сфере при ревматоидном артрите после применения гемопоэтических клеток эмбриональной печени. Проблемы криобиологии. 2003; (3): 45–53.
4. Гржибовский АМ, Иванов СВ, Горбатова МА. Сравнение количественных данных двух независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии. Наука и здравоохранение. 2016; (2): 5–28.
5. Грищенко ВИ, Лобынцева ГС, Вотякова ИА, Шерешков СИ. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени. Киев: Наукова думка; 1988. 192 с.
6. Никольская ЕИ, Бутенко ГМ. Структурно-функциональная организация костномозговых ниш гемопоэтических стволовых клеток. Клітинна та органна трансплантологія. 2016; 4(1): 82–100.
7. Никольский ИС, Никольская ВВ, Зубов ДА. Фибробласто- и масто-лимфоцитарные розетки. Российский аллергологический журнал. 2011; 1(4): 260–1.
8. Нікольська КІ. Особливості культивування та контактної взаємодії *in vitro* криоконсервованих мультипотентних стромальних клітин тимуса з гемопоетичними клітинами. Проблеми криобіології і криомедицини. 2018; 28(1):5–13.
9. Панченко ЛМ, Сыч ЕЕ, Яценко АП. Эффективность клонирования стволовых стромальных клеток костного мозга человека в присутствии высокопористой стеклокерамики и её растворимость *ex vivo*. Вісник ортопедії, травматології та протезування. 2014; (4): 50–4.
10. Петренко ЮА, Тарасов АИ, Грищенко ВИ, Петренко АЮ. Влияние криоконсервирования на иммунологическую активность и фенотипический состав лимфоидных клеток эмбриональной печени человека. Проблемы криобиологии. 2002; (4): 76–9.
11. Реброва ОЮ. Статистический анализ медицинских данных: применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: Медиа Сфера; 2002. 312 с.
12. Фрешни РЯ. Культура животных клеток: практическое руководство. Москва: Бином. Лаборатория знаний; 2010. 691 с.
13. Bifari F, Lisi V, Mimiola E, et al. Immune modulation by mesenchymal stem cells. Transfus Med Hemother. 2008; 35(3): 194–204.
14. Brown C, McKee C, Bakshi S, et al. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential. J Tissue Eng Regen Med. 2019; 13(9): 1738–55.
15. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem. 2004; 329(1): 77–84.
16. Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. Immunol Cell Biol. 2013; 91(1): 32–9.
17. Kim WK, Jung H, Kim DH, et al. Regulation of adipogenic differentiation by LAR tyrosine phosphatase in human mesenchymal stem cells and 3T3-L1 preadipocytes. J Cell Sci. 2009; 122(22): 4160–7.
18. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. Nat Rev Immunol. 2012; 12(5): 383–96.
19. Patenaude J, Perreault C. Thymic mesenchymal cells have a distinct transcriptomic profile. J Immunol. 2016; 196(11): 4760–70.
20. Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA. Mesenchymal stem cells: methods and protocols. Totowa: Humana Press; 2008. 192 p.
21. Robey P. 'Mesenchymal stem cells': fact or fiction, and implications in their therapeutic use. F1000Res. 2017; 20(6): F1000 Faculty Rev-524.
22. Wolfrom C, Raynaud N, Maigne J, et al. Periodic fluctuations in proliferation of SV-40 transformed human skin fibroblast lines with prolonged lifespan. Cell Biol Toxicol. 1994; 10(4): 247–54.
2. Bifari F, Lisi V, Mimiola E, et al. Immune modulation by mesenchymal stem cells. Transfus Med Hemother. 2008; 35(3): 194–204.
3. Brown C, McKee C, Bakshi S, et al. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential. J Tissue Eng Regen Med. 2019; 13(9): 1738–55.
4. Freshney RJ. Culture of animal cells. Moscow: Binom. Laboratoriya Znaniy; 2010. 691 p. Russian.
5. Goltsev AN, Dubrava TG, Kozlova YuA, et al. Investigation of the therapeutic effect of transfusion of cryopreserved hematopoietic stem cells from different sources in the treatment of experimental adjuvant arthritis. Transplantation. 2007; 9 (1): 28–30. Russian.
6. Goltsev AN, Rassokha IV, Lutsenko ED, et al. Intercellular interactions in immunocompetent sphere at rheumatoid arthritis following the application of hematopoietic embryonic liver cells. Problems of Cryobiology. 2003; (3): 45–53.
7. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem. 2004; 329(1): 77–84.
8. Grishchenko VI, Lobyntseva GS, Votyakova IA, Shereshkov SI. Hematopoietic cells of the embryonic liver. Kyiv: Naukova dumka; 1988.
9. Grzhibovsky AM, Ivanov SV, Gorbatova MA. Analysis of quantitative data in two independent samples using Statistica and SPSS software: parametric and non-parametric tests. Science & Healthcare. 2016; (2): 5–28. Russian.
10. Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. Immunol Cell Biol. 2013; 91(1): 32–9.
11. Kim WK, Jung H, Kim DH, et al. Regulation of adipogenic differentiation by LAR tyrosine phosphatase in human mesenchymal stem cells and 3T3-L1 preadipocytes. J Cell Sci. 2009; 122(22): 4160–7.
12. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. Nat Rev Immunol. 2012; 12(5): 383–96.
13. Nikolska KI. Peculiarities of culture and *in vitro* contact interaction of cryopreserved thymic multipotent stromal cells and hemopoietic cells. Probl Cryobiol Cryomed. 2018;28(1):5–13.
14. Nikolskaya EI, Butenko GM. Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. Cell and Organ Transplantation 2016; 4(1): 82–100.
15. Nikolsky IS, Nikolskaya VV, Zubov DA. Fibroblast and masto-lymphocytic rosettes. Russian Journal of Allergy. 2011; 1 (4): 260–1. Russian.
16. Panchenko LM, Sych EE, Yatsenko AP. Efficiency of cloning of human bone marrow stromal stem cells in the presence of highly porous glass ceramics and its *ex vivo* solubility. Herald of Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics. 2014; (4): 50–4.
17. Patenaude J, Perreault C. Thymic mesenchymal cells have a distinct transcriptomic profile. J Immunol. 2016; 196(11): 4760–70.
18. Petrenko YA, Tarasov AI, Grischenko VI, Petrenko AY. Cryopreservation effect on immunologic activity and phenotypic composition of human embryonic liver lymphoid cells. Probl Cryobiol Cryomed. 2002; (4): 76–9.
19. Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA. Mesenchymal stem cells: methods and protocols. Totowa: Humana Press; 2008. 192 p.
20. Rebrova OY. Statistical analysis of medical data: application of the Statistica software package. Moscow: Media Sfera; 2002. 312 p. Russian.
21. Robey P. 'Mesenchymal stem cells': fact or fiction, and implications in their therapeutic use. F1000Res. 2017; 20(6): F1000 Faculty Rev-524.
22. Wolfrom C, Raynaud N, Maigne J, et al. Periodic fluctuations in proliferation of SV-40 transformed human skin fibroblast lines with prolonged lifespan. Cell Biol Toxicol. 1994; 10(4): 247–54.

