

УДК: 612.014.43:615.012.41:611-013.8:612.014:616.8-009.1-085.851.8-092.9
doi: 10.22494/cot.v8i1.109

Метод кріоконсервації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з Вартонових драглів пуповини людини із зниженою концентрацією ДМСО



Цимбалюк В. І.^{1,3}, Дерябіна О. Г.^{2,4}, Шувалова Н. С.², Вербовська С. А.³, Пічкур Л. Д.³, Олексенко Н. П.³, Кордюм В. А.^{2,4}

¹Національна академія медичних наук України, Київ, Україна

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

³ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

⁴Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна

e-mail: oderyabina@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Нагальною проблемою тривалого зберігання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) є вдосконалення протоколу їх кріоконсервації для подальшого застосування зі збереженням терапевтичних властивостей і мінімізацією ризиків негативного впливу на здоров'я реципієнта. Як стандартний кріоконсервант на практиці застосовується суміш 90 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС) і 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО), який, однак, може викликати різноманітні небажані реакції. Тому актуальним є вивчення можливості зниження концентрації потенційно небезпечного ДМСО за рахунок додавання в суміш для кріоконсервування клітин інших компонентів.

МЕТА. Встановити ефективність кріоконсервації ММСК Вартонових драглів людини при використанні кріоконсервантів різного складу шляхом дослідження проліферативної активності, фенотипу і особливостей морфології клітин в культурі *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ. Було досліджено кріопротекторний ефект різних комбінацій ДМСО, етиленгліколю, сахарози та трегалози. Ефективність оцінювали за показниками життєздатності клітин, їх адгезивними властивостями, швидкістю клітинної експансії та формування моношару, а також експресією основних маркерів ММСК.

РЕЗУЛЬТАТИ. Показано, що найбільш ефективною комбінацією є 4 % ДМСО із додаванням 6 % трегалози – її застосування забезпечує при розморожуванні найвищий рівень збереження життєздатності клітин, а також їх адгезивних та проліферативних властивостей. Інші комбінації складу кріосередовища показали значно повільніше збільшення кількості клітин, в деяких варіантах моношар не утворювався взагалі. Для всіх досліджених варіантів мало місце збереження поверхневих маркерів, притаманних ММСК.

ВИСНОВКИ. Отримані результати свідчать про можливість зниження концентрації ДМСО до 4 % в кріосередовищі для кріоконсервування ММСК зі збереженням їх життєздатності, проліферативної активності та характерних поверхневих маркерів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини; Вартонові драгли; кріоконсервація; ДМСО; трегалоза; сахароза, етиленгліколь

За останні роки прогрес в лікуванні запально-дегенеративних уражень центральної нервової системи (ЦНС) пов'язують з розвитком клітинних технологій [1]. Одними з найбільш перспективних для використання в клінічній практиці є мультипотентні мезенхі-

мальні стромальні клітини (ММСК), зокрема, клітини Вартонових драглів пуповини [2, 3]. Завдяки тому, що пупковий канатик закладається на ранніх строках вагітності, ці клітини мають значно більший потенціал диференціювання та терапевтичний потенціал

[4], порівняно з ММСК з інших джерел, оскільки в них зберігаються деякі маркери, притаманні ембріональним стовбуровим клітинам [5]. Саме тому клітини з даного джерела здатні ефективно впливати на вогнища запалення у ЦНС, мають виражені імунорегулюючі властивості. Крім того, цей тип ММСК може бути нарощений у великій кількості за достатньо короткий термін при відносно простому культивуванні [6-9]. Також важливим є те, що їх отримання не має морально-етичних обмежень.

З огляду на перспективу клінічного застосування ММСК виникла потреба розробки методу тривалого зберігання (кріоконсервування) ММСК з урахуванням режиму заморожування, виду кріоконсерванту і часу зберігання клітинного матеріалу. Результат їх клінічного застосування залежить від якості клітинного матеріалу, тому слід враховувати цей вплив і мінімізувати його негативні наслідки.

Як стандартний кріопротектор в складі кріосередовища застосовується диметилсульфоксид (ДМСО) [2, 10]. Для успішного заморожування різних популяцій клітин потрібна оптимальна концентрація даного реагенту. При цьому необхідно враховувати вплив ДМСО на клітинну мембрану при його додаванні в клітинну суспензію ще до початку заморожування. Моделювання бішарових систем клітинної мембрани показало, що вплив ДМСО на подвійний ліпідний шар залежить від концентрації ДМСО в розчині. При проникненні молекул ДМСО всередину фосфоліпідного бішару мембрани клітини, при концентрації ДМСО від 2,5 до 7,5 % включно, спостерігається зменшення товщини бішару. При концентраціях ДМСО від 10 % і вище, крім зменшення товщини бішару спостерігається формування гідрофільних пор і дефектів у клітинній мембрані. Концентрація ДМСО, що перевищує 20 %, веде до повної руйнації ліпідного бішару [11]. Для кріоконсервації клітин кінцева концентрація ДМСО, що становить 10 %, є найбільш поширеною. Встановлено, що зниження концентрації ДМСО нижче 5 % призводить до значних втрат клітинного матеріалу, а концентрація вище 10 % не сприяє підвищенню ефективності його збереження, але небезпечна для пацієнта [12].

При застосуванні ДМСО як кріопротектора в експериментальних та клінічних дослідженнях можливі певні небажані реакції. Так, серед побічних ефектів, що спостерігаються у близько 50 % тварин та людей після введення кріозбережених з використанням ДМСО ММСК, зустрічаються наступні: нудота, блювання, діарея, болі у животі, головні болі, зниження та підвищення кров'яного тиску. При використанні не заморожених клітин таких негативних ефектів не спостерігали. Значно рідше, але задокументовано й більш серйозні стани, спричинені порушеннями у роботі серцево-судинної та дихальної систем: аритмії, пригнічення дихання, фатальний збій серцевого ритму, напади, зворотня лейкоенцефалопатія та навіть інсульт [13]. Крім того, ДМСО не сертифікований для внутрішнього застосування (парентерального, per os, тощо) у лікуванні пацієнтів. Наприклад, на сьогодні FDA дозволяє лише внутрішньоміхурові інстиляції ДМСО при лікуванні інтерстиційного циститу. Накопичення такої інформації спонукало до пошуку альтернативних речовин, що можуть захищати клітину від ушкоджень наднизькими температурами, і бути безпечними при введенні в організм [14].

Аналіз літератури показав, що при кріоконсервації клітин частину ДМСО можна замінити дисахарами [15-17]. Однак, ці речовини належать до непроникних кріопротекторів, і без участі пронижного агента не забезпечують повного захисту від утворення кристаліків криги [15, 16]. Тому, вочевидь, концентрацію ДМСО у кріопротекторному середовищі можна знизити і до складу такого розчину додати дисахариди (наприклад, трегалозу). В окремих роботах показано, що багатоконпонентні кріопротектори є більш безпечними [16].

У зв'язку з цим, метою даної роботи було: встановити *in vitro* ефективність кріоконсервації ММСК Вартонових драглів пуповини людини при використанні кріоконсервантів різного складу шляхом дослідження проліферативної активності, фенотипу і особливостей морфології клітин в культурі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН

Культуру ММСК Вартонових драглів пупкового канатика людини було отримано методом експлантів. Пупковий канатик отримували під час нормальних пологів від здорової породіллі за інформованою згодою. Пуповину витримували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин в поживному середовищі DMEM (*BioWest*, Франція) з 10-кратною концентрацією антибіотиків стрептоміцин та пеніцилін (*BioWest*, Франція) в концентрації 1 мг/мл та 1000 од/мл., відповідно, після чого промивали фізіологічним розчином NaCl і подрібнювали матеріал на шматочки до 0,5 мм. Отримані шматочки вміщували в поживне середовище DMEM/F12 (*BioWest*, Франція) з 10 % ембріональної телячої сироватки (ETC) (*BioWest*, Франція), вносили у флакони для культури клітин площею 25 см² (*Bioswisstec*, Швейцарія) і культивували в інкубаторі з вмістом CO₂ 5 % при 37 °C до появи клонів. Поживне середовище замінювали на свіже кожні 3 доби. При досягненні 70-80 % конфлуентності був отриманий нульовий пасаж ММСК пуповини.

Культуру ММСК було пасажовано за стандартною методикою з використанням розчину трипсину 0,25 % та EDTA 0,02 % (*BioWest*, Франція) і культивовано протягом 2-х пасажів, як описано раніше. В дослідях було використано культури ММСК 2-го пасажу. На рівні 1-го пасажу клітини були охарактеризовані за мінімальними поверхневими маркерами, типовими для ММСК: CD73, CD90, CD105 (експресія понад 95 %) та CD34 і CD45 (експресія менше 2 %) [18] та за здатністю диференціюватись в три типи клітин – адипо-, остео- та хондроцити.

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА РОЗМОРОЖУВАННЯ КЛІТИН

Для кріоконсервації використовували середовища з різним вмістом ДМСО (*Helicon*, Росія) та комбінаціями ETC (*BioWest*, Франція), трегалози (*BioFroxx*, Німеччина), етиленгліколю (*LaboChem*, Німеччина), сахарози (*BioFroxx*, Німеччина) (табл. 1).

Культури ММСК 2-го пасажу були відкріплені від поверхні культурального посуду за стандартною методикою, число клітин в популяції підраховано за допомогою гемоцитометра Горяєва. Зразки були розділені на аліквоти по 3•10⁶ клітин та центрифуговані в середовищі DMEM/F12 при 800 xg протягом 10 хвилин. Осад ресуспендували в 3 мл охолоджених до 8-10 °C експериментальних кріосередовищ кожного варіанту, розфасовували по 1•10⁶ клітин/мл в кріопробірки та перенесли в програмний заморожувач Cryo 500 (*Planer*, Великобританія). Швидкість охолодження складала 1 °C/хв. Після досягнення температури -80 °C зразки були перенесені до кріосховища з рідким азотом, де зберігалися протягом 20 днів.

Після 20 днів зберігання експериментальні зразки були розморожені при 38 °C впродовж 1 хвилини, вміст кріопробірок кожного варіанта був внесений в 40 мл середовища DMEM без сироватки, обережно перемішаний та центрифугований протягом 10 хв при 800 xg. Для кожного варіанта середовища було досліджено по 3 заморожених зразки ММСК. Всі досліді проведені на одній культурі.

ВАРІАНТ

СКЛАД СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

ВАРІАНТ	СКЛАД СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ
1	10 % ДМСО, 90 % ETC (стандартне середовище, контроль)
2	35 % трегалоза, 65 % ETC
3	25 % етиленгліколь, 10 % сахароза, 65 % ETC
4	4 % ДМСО, 6 % трегалоза, 90 % ETC
5	15 % етиленгліколь, 3 % ДМСО, 10 % сахароза, 12 % трегалоза, 60 % ETC



Таблиця 1. Склад експериментальних середовищ для кріоконсервації

Обладнання для виконання усіх процедур кріоконсервування та відігріву клітин було люб'язно надано ТОВ «Гемафонд» (м. Київ).

ВИЗНАЧЕННЯ ВІДНОСНОЇ КІЛЬКОСТІ ЖИТТЄЗДАТНИХ КЛІТИН

Для оцінки загальної кількості та співвідношення живих та мертвих клітин після відігріву та ресуспендування було відібрано аліквоту середовища з клітинами (20 мкл), клітини забарвлено суправітальним барвником трипановим синім (*AppliChem*, Німеччина) і підраховано в гемоцитометрі Горяєва.

АНАЛІЗ ПРОЛІФЕРАЦІЇ

Для оцінки проліферативної активності розморожених клітин після підрахунку з кожного варіанту було відібрано об'єм середовища, що містив 100 тис. живих клітин, центрифуговано в фосфатному буферному розчині (*Biowest*, Франція) та внесено в культуральні флакони площею 25 см² у повне ростове середовище, що складалось з поживного середовища DMEM (*Biowest*, Франція), яке містило 10 % ETC (*Biowest*, Франція) та антибіотики – пеніцилін та стрептоміцин (*Biowest*, Франція) в концентраціях 100 од/мл та 100 мкг/мл, відповідно. Через 2 дні клітини було знято з поверхні за стандартною методикою за допомогою розчину трипсину-EDTA, їх кількість підраховано в гемоцитометрі.

Швидкість подвоєння популяції через 72 години розраховували за формулою [19]:

$$\text{DoublingTime} = \frac{\text{duration} * \log(2)}{\log(\text{FinalConcentration}) - \log(\text{InitialConcentration})}$$

В процесі культивування спостереження за культурами проводили за допомогою інвертованого мікроскопа DM IL (*Leica*, Німеччина). Мікрофотографії культур було зроблено за допомогою камери Power Shot A640 (*Canon*, Японія).

ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ПОВЕРХНЕВИХ МАРКЕРІВ

Аналіз експресії поверхневих маркерів MMCK CD105, CD90, CD73, CD34 та CD45 як мінімальних критеріїв для визначення мезенхімальних стромальних клітин згідно з рекомендаціями Міжнародного товариства клітинної терапії [20] проведено методом прямої цитометрії на базі ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» згідно стандартних протоколів. До 2-5·10⁵ клітин в 100 мкл буферу CellWash (*BD Bioscience*, США) додавали моноклональні антитіла в робочій концентрації 1 мкг/мл та інкубували протягом 30 хв при 4 °C в захищеному від світла місці. Потім клітини відмивали в 1 мл буферу CellWash, центрифугуючи при 400 xg протягом 5 хв, ресуспендували у 300 мкл буферу CellWash та безпосередньо перед дослідженням фільтрували через клітинний фільтр з діаметром пор 70 мкм (*BD Falcon*, США). Для визначення життєздатності до 2·10⁵ клітин в 300 мкл буферу CellWash додавали 5 мкл 7-аміноактиноміцину D (*BD Bioscience*, США) та інкубували протягом 5 хв. Зразки було аналізовано на лазерному клітинному сортері BD FACSAria (*BD Bioscience*, США) із застосуванням програмного забезпечення BD FACSDiva 6.2.1, записуючи як мінімум 20 тис. клітин для кожного зразка. Для імунофенотипування використовували кон'юговані з флуорохромами моноклональні антитіла миші проти антигенів людини anti-CD105 PerCP-Cy5.5 (кат. № 560819), anti-human CD90 FITC (кат. № 555595); anti-CD73 APC (кат. № 560847), anti-CD34 APC (кат. № 345804), anti-CD45 FITC (кат. № 345808) (всі – *BD Bioscience*, США).

ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ММСК ДО ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ

Вивчали здатність до направленої диференціації в бік адипо-, хондро- та остеогенезу нативних клітин пуповини та після їх заморожування-відтаювання, оскільки ця характеристика використовується для віднесення клітин до ММСК [20]. Для диференціації клітин використовували загальноприйняті методи [21, 22]. При проведенні індукованого адипогенезу клітини вносили в середовище для

диференціації, яке містило поживне середовище DMEM, 10 % ETC, 50 мкМ/л індометацину, 10 мкМ інсуліну, 1 мкМ/л дексаметазону та 0,5 мМ 3-ізобутил-1-метилксантину (всі – *Sigma-Aldrich*, США), і культивували протягом двох тижнів. Індукцію адипогенезу підтверджували забарвленням барвником Oil Red O (*Sigma-Aldrich*, США) цитопрепаратів, попередньо фіксованих в 4 % розчині параформальдегіду за стандартною методикою [23]. Для диференціації в напрямку остеоцитів використовували середовище DMEM з низьким вмістом глюкози з додаванням 10 % ETC, 0,1 мкМ дексаметазону, 200 мкМ L-аскорбат-2-фосфату та 10 мМ β-гліцерол фосфату (всі – *Sigma-Aldrich*, США), в якому клітини вирощували протягом 21 доби, після чого фіксували в 4 % розчині параформальдегіду та забарвлювали барвником Alizarin Red S (*Sigma-Aldrich*, США) [24]. Індукцію хондрогенезу здійснювали за класичною методикою – додаванням у середовище культивування DMEM з високим вмістом глюкози з 100 нМ дексаметазону, 50 мкг/мл фосфату аскорбінової кислоти, основного фактору росту фібробластів (FGF), 100 мкг/мл пірвату натрію, 1,25 мкг/мл сироваткового альбуміну бика, 1 % суміші інсуліну, трансферину і селену (ITS) та трансформуючий фактор росту (TGF-β) з розрахунку 10 нг/мл (всі – *Sigma-Aldrich*, США). Культивування проводили в культурі мікрмаси, середовище замінювали кожні 3 дні [22]. Через 3 тижні зразки фіксували в 4 % розчині параформальдегіду та забарвлювали альціановим синім (*Diapath*, Італія) і аналізували під мікроскопом [25].

СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ

Достовірність різниці між значеннями показників у групах визначали за допомогою критерію Мана-Уїтні з використанням програмного забезпечення MS Excel (*Microsoft*, США). Відмінності між групами порівняння вважали достовірними при p < 0,05. Дані представлені у вигляді середнього значення +/- стандартне відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Маючи за контроль середовище, яке складалось з 10 % ДМСО і 90 % ETC, ми досліджували різні комбінації кріопротекторних речовин, які повинні були забезпечити виконання наступних умов:

- максимально високий відсоток виживання клітин після заморожування;
- мінімальний вміст ДМСО для запобігання негативних реакцій організму при використанні клітин для трансплантації у людей;
- здатність розморожених клітин проліферувати з такою ж швидкістю, як в контрольному варіанті середовища;
- збереження мінімальних поверхневих маркерів на рівні контролю.

ВАРІАНТ	СКЛАД СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ	ВІДСОТОК ЖИВИХ КЛІТИН, n=3
1	10 % ДМСО + 90 % ETC	95,9 ± 0,1
2	35 % трегалози + 65 % ETC	31,3 ± 0,07*
3	25 % етиленгліколю + 10 % сахарози+65 % ETC	71,07 ± 0,03*
4	4 % ДМСО+6 % трегалози + 90 % ETC	94,3 ± 0,2
5	15 % етиленгліколю + 3 % ДМСО + 10 % сахарози + 12 % трегалози + 60 % ETC	85,4 ± 0,1*



Таблиця 2. Відсоток живих клітин в розморожених зразках при використанні кріосередовищ різного складу

Примітка: * - p ≤ 0,05 в порівнянні з варіантом 1.

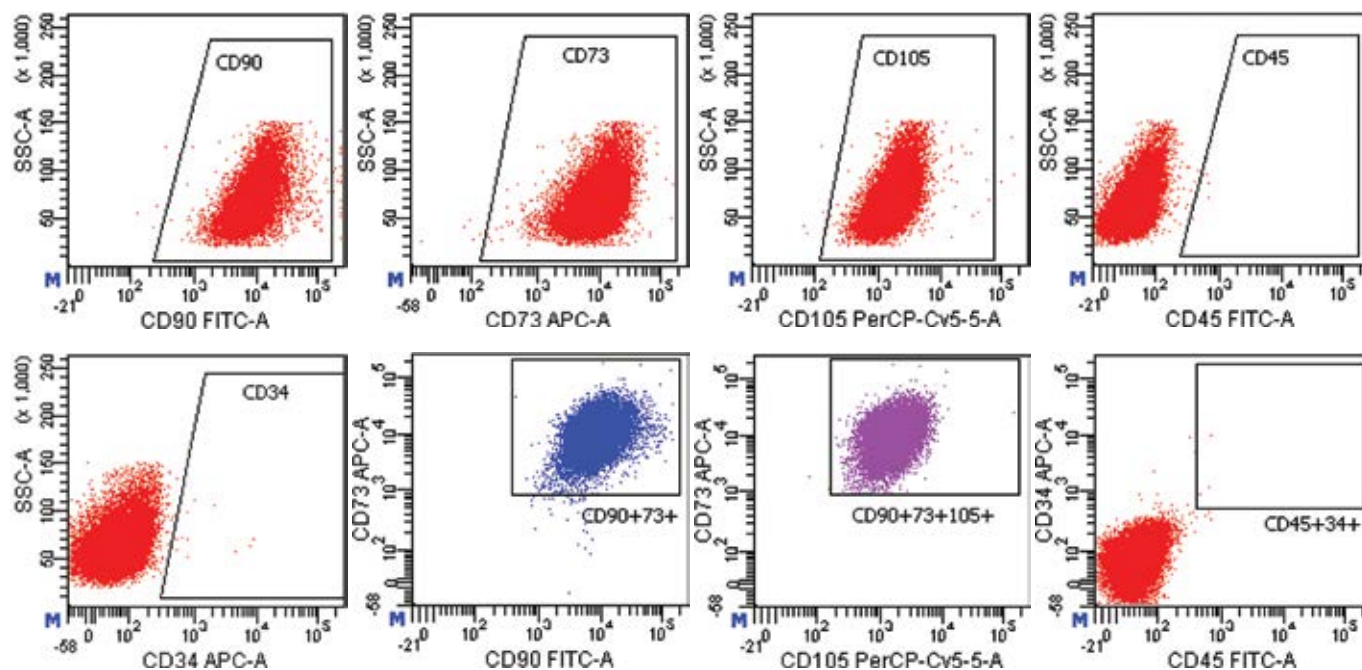


Рис. 1. Dot-dot гістограми експресії маркерів CD90, CD73, CD105, CD34, CD45 в культурі ММСК пуповини людини після заморожування кріосередовищі, що містило 4 % ДМСО, 6 % трегалози, 90 % ЕТС (варіант 4).

В результаті проведених досліджень було показано, що кількість клітин після розморожування в усіх варіантах була практично однаковою і складала $0,925-0,940 \cdot 10^6$ клітин у порівнянні з $1 \cdot 10^6$ до кріоконсервування. Причиною зменшення кількості клітин, найбільш вірогідно, є втрати в результаті відмивання від ДМСО.

Дані щодо чисельності живих клітин в популяції ММСК після кріоконсервації наведені в таблиці 2. Ці значення були отримані при забарвленні суспензії трипановим синім і практично співпадали з даними, отриманими при цитофлуорометрії. Вони свідчать про те, що із досліджених середовищ для кріоконсервації найкраще сприяють збереженню життєздатності клітин варіанти 1 та 4, що складаються з 10 % ДМСО + 90 % ЕТС та 4 % ДМСО + 6 % трегалози + 90 % ЕТС відповідно. При цьому найнижчий вміст живих клітин спостерігався при проведенні кріоконсервації у середовищі № 2 ($p \leq 0,05$), що складалося з 25 % етиленгліколю + 10 % сахарози + 65 % ЕТС (табл. 2).

Згідно наших даних різні середовища для кріоконсервування не змінили рівень експресії мінімальних поверхневих маркерів – CD73, CD90 і CD105 (рис. 1). У всіх варіантах більше 90 % клітин експресували їх, в той час як менше 1 % клітин експресували гемопоетичний маркер CD45 (таблиця 3).

Дані по збереженню маркерів ММСК при кріоконсервації співпадають з результатами інших дослідників [26]. Така стабільність маркерів при змінах інших характеристик може свідчити про можливість їх використання лише для грубої характеристики популяції клітин, в першу чергу, для підтвердження їх належності до типу мезенхімальних стромальних клітин.

Належність клітин до типу мультипотентних мезенхімальних стромальних підтверджується також їх здатністю до направленої диференціювання в остеогенному, хондрогенному та адипогенному напрямках. Нами були виконані дослідження по вивченню можливості диференціації ММСК після заморожування і відтаювання в адипо-, остео- та хондроцити. Паралельно виконували таку ж диференціацію нативних ММСК без заморожування. Показано, що дана властивість ММСК не змінюється після кріоконсервації, що підтверджується наявністю забарвлених Oil Red ліпідних гранул при диференціюванні в адипоцити. При остеогенному диференціюванні виявлено забарвлення алізариним депозитів кальцію в яскравий помаранчево-червоний колір, в той час як недиференційовані ММСК були

ВАРІАНТ	CD90	CD73	CD105	CD34	CD45
До кріоконсервації	94,9	97,7	97,0	6,0	0,2
1	97,2	98,5	98,8	0,4	0,1
2	99,9	100	96,3	0,2	0,1
3	99,8	100	99,2	0,4	0,1
4	99,9	100	100	0,1	0,0
5	99,9	100	98,9	0,3	0,1

Таблиця 3. Експресія мінімальних поверхневих маркерів ММСК після заморожування в кріосередовищах різного складу, %. Примітки: 1 – 10 % ДМСО + 90 % ЕТС; 2 – 35 % трегалози + 65 % ЕТС; 3 – 25 % етиленгліколю + 10 % сахарози + 65 % ЕТС; 4 – 4 % ДМСО + 6 % трегалози + 90 % ЕТС; 5 – 15 % етиленгліколю + 3 % ДМСО + 10 % сахарози + 12 % трегалози + 60 % ЕТС.

блідорозовими. Також продемонстровано наявність характерних яскраво-блакитних скупчень протеогліканів, забарвлених альціаном синім, навколо клітин, що диференціювались у хондроцити. Отримані нами дані щодо розморожених клітин підтверджуються результатами інших авторів [27, 28], які свідчать про збереження здатності кріозаморожених клітин до класичного диференціювання в три типи клітин – адипо-, остео- та хондроцити.

Отримані результати викликають цікавість, оскільки показують, що на дану характеристику концентрація ДМСО впливу не має, як і у випадку поверхневих маркерів. Наші результати співпадають з інформацією, наведеною в роботі Bahsoun S. та ін. [29], яка узагальнює дані багатьох авторів, що проводили кріоконсервацію ММСК з використанням як готових середовищ від виробників, в тому числі зі зниженою концентрацією ДМСО, так і кріоконсервантів, приготованих самостійно в лабораторії безпосередньо перед використанням. В той же час, слід відмітити, що в деяких дослідженнях, наведених в даному огляді, спостерігалось як підсилення, так і зниження окремих кількісних показників диференціації (наприклад, активність лужної

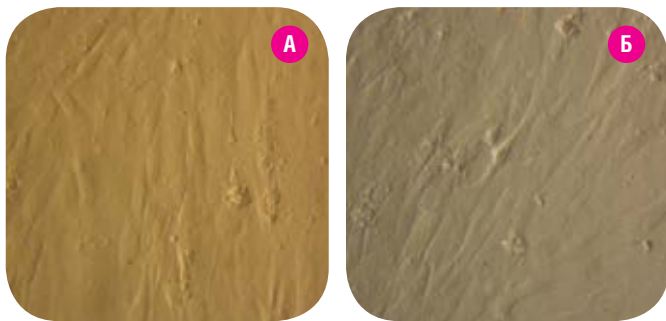


Рис. 2. Мікрофотографії культур ММСК після заморожування в кріосередовищі 1 (10 % ДМСО + 90 % ЕТС); фазово-контрастна мікроскопія; $\times 100$. **А** – через 1 добу після розморожування, **Б** – через 2 доби після розморожування.



Рис. 5. Мікрофотографії культур ММСК після заморожування в кріосередовищі 4 (4 % ДМСО + 6 % трегалози + 90 % ЕТС); фазово-контрастна мікроскопія; $\times 100$. **А** – через 1 добу після розморожування, **Б** – через 2 доби після розморожування.

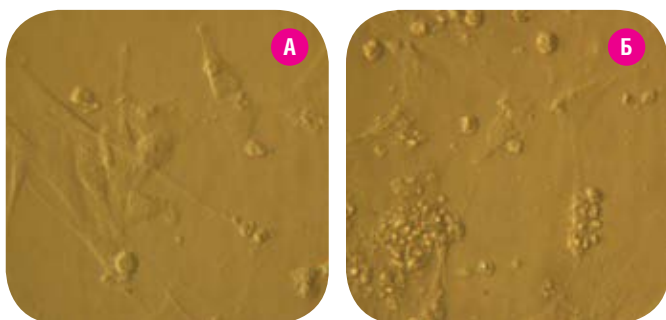


Рис. 3. Мікрофотографії культур ММСК після заморожування в кріосередовищі 2 (35 % трегалози + 65 % ЕТС); фазово-контрастна мікроскопія; $\times 100$. **А** – через 1 добу після розморожування, **Б** – через 2 доби після розморожування.

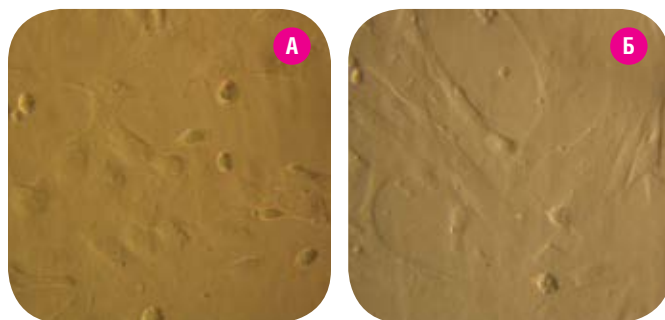


Рис. 6. Мікрофотографії культур ММСК після заморожування в кріосередовищі 5 (15 % етиленгліколю + 3 % ДМСО + 10 % сахарози + 12 % трегалози + 60 % ЕТС); фазово-контрастна мікроскопія; $\times 100$. **А** – через 1 добу після розморожування, **Б** – через 2 доби після розморожування.

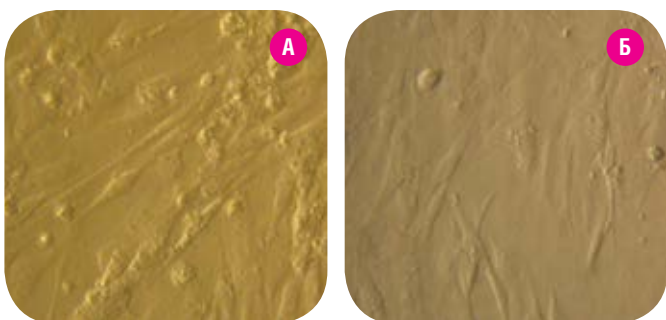


Рис. 4. Мікрофотографії культур ММСК після заморожування в кріосередовищі 3 (25 % етиленгліколю + 10 % сахарози + 65 % ЕТС); живий незабарвлений препарат, фазово-контрастна мікроскопія; $\times 100$. **А** – через 1 добу після розморожування, **Б** – через 2 доби після розморожування.



Рис. 7. Мікрофотографії культур ММСК після заморожування в кріосередовищі 3 (25 % етиленгліколю + 10 % сахарози + 65 % ЕТС) через 5 діб після розморожування; фазово-контрастна мікроскопія; $\times 100$.

фосфатази) після кріоконсервації ММСК, хоча, в цілому, якісні характеристики зберігалися.

Таким чином, ні один з кріоконсервантів, які були використані в наших досліджах, не змінив ні експресію поверхневих маркерів, ні здатність кріоконсервованих клітин до диференціації. У зв'язку з цим постає питання, які характеристики змінюються при кріоконсервації. Тому наступним етапом досліджень було вивчення проліферації ММСК після кріоконсервації з використанням різних кріоконсервантів.

Швидкість росту клітин після розморожування в різних варіантах кріосередовищ значно відрізнялася. Через 1 добу в варіантах 1 та 4 спостерігали значну кількість адгезованих до пластику розпластаних клітин (**рис. 2-А та рис. 5-А**). Після зняття їх з поверхні пластику та підрахунку через 2 доби виявлено, що при нанесенні $1 \cdot 10^5$ клітин їх

кількість збільшилась до 380-390 тис., що відповідає звичайному темпу росту ММСК Вартонових драглів (**рис. 2-Б та рис. 5-Б**). Через 3 доби спостерігали майже 80 % конфлюентності моношару, що свідчило про інтенсивне розмноження клітин. У варіанті 2 спостерігали мінімальну кількість живих клітин, через 1 добу зустрічалися поодинокі розпластані клітини, а через 2 доби мала місце суцільна дегенерація клітин (**рис. 3-А, Б**). Варіанти 3 та 5 займали проміжне положення. Частина клітин закріпилася та розпласталася, однак через 2 доби кількість клітин була лише 200 тис. (**рис. 4 та 6-А, Б**). При подальшому спостереженні до 5-ї доби зростання їх кількості уповільнювалося, а моношар не формувався (**рис. 7**).

Пояснення даному феномену знайшлося при визначенні швидкості подвоєння ММСК після розморожування. Отримані результати наведені в **таблиці 4**, з яких видно, що найменший час подвоєння спостерігався в варіантах 1 і 4 (25-26 год.), саме тому вже через 48 год. в цих варіантах спостерігали високу конфлюентність моношару. Навпаки, для варіантів 2 і 3 був визначений значно довший час

ВАРІАНТ	СКЛАД СЕРЕДОВИЩА	ЧАС ПОВДВОЄННЯ ПОПУЛЯЦІЇ, ГОДИНИ
1	10 % ДМСО + 90 % ЕТС	25,78 ± 0,1
2	35 % трегалози + 65 % ЕТС	83,72 ± 0,12*
3	25 % етиленгліколю + 10 % сахарози + 65 % ЕТС	63,30 ± 0,1*
4	4 % ДМСО + 6 % трегалози + 90 % ЕТС	26,18 ± 0,07
5	15 % етиленгліколю + 3 % ДМСО + 10 % сахарози + 12 % трегалози + 60 % ЕТС	33,68 ± 0,09

Таблиця 4. Час подвоєння популяції ММСК при використанні кріосередовищ різного складу

Примітка: * - $p \leq 0,05$ в порівнянні з варіантом 1.

подвоєння популяції – 83 та 63 год. відповідно, що знайшло відображення в повільному прирості кількості клітин, а за рахунок відсутності контакту клітин призвело до їх дегенерації у варіанті 2 або до неможливості утворення моношару у варіантах 3 та 5. Цікаво, що для варіанту 5 був визначений час подвоєння популяції, який був значно коротшим (33 год.), ніж у варіанті 3, але проліферація ММСК в цих варіантах була практично однаковою. Можливо, це пов'язано зі зміною метаболізму клітин при кріозберіганні в даному конкретному кріосередовищі, враховуючи, що варіант 5 містить максимальну, порівняно з іншими варіантами, кількість компонентів. Але це припущення є лише спекулятивним і потребує спеціальних досліджень по впливу окремих компонентів на збереження метаболізму ММСК незмінним.

Отримані нами результати відрізняються від тих, що описані у згаданому вище огляді [29]. В ньому проаналізовані дані багатьох авторів з цього питання, в результаті чого названі характеристики, які не змінюються після кріоконсервації, та які змінюються. До перших відносяться проліферація, морфологія, диференціація і імунотип. Якщо імунотип, диференціація не змінювались і в наших експериментах, то на відміну від описаної іншими авторами стабіль-

ної проліферації, нами було показано, що при використанні різних кріоконсервантів вона може змінюватись. Можливо, це пов'язане з тим, що в нашій роботі ми вивчали ММСК пупкового канатика, в той час як інші автори працювали з стромальними клітинами кісткового мозку. Хоча в окремих описаних в огляді роботах має місце незначне зменшення проліферативної активності клітин після заморожування, особливо це стосується ММСК більш пізніх пасажів. Згідно наших результатів, заморожування ММСК після 2-го пасажу дозволяє знизити концентрацію ДМСО з 10 % до 4 % при додаванні 6 % трегалози – при використанні такого складу кріосередовища спостерігали максимальне збереження проліферативної активності ММСК пуповини людини після кріоконсервації.

До варіабельних характеристик, які змінюються при кріоконсервації, відносяться життєздатність, прикріплення, імунотип та метаболізм [29]. Отримані нами результати по збереженню життєздатності клітин підтверджують це, а що стосується метаболічних характеристик та властивості імунотипу, то це є особливо важливим з огляду клінічного використання ММСК, оскільки саме вони є найбільш цінними. Стосовно цих характеристик існують розбіжності в проаналізованих роботах – від повного збереження до значного зменшення метаболічної активності, тому для підтримання даних властивостей ММСК на необхідному рівні необхідно відпрацювати оптимальні умови їх кріоконсервації.

Отримані нами результати дозволили зробити висновок про можливість значного зменшення концентрації ДМСО в середовищі для заморожування до 4 % замість 10 % за рахунок внесення не менше 6 % трегалози. Такий склад кріосередовища є найбільш придатним для використання, зважаючи на те, що ДМСО являє собою проникний кріопротектор, який протидіє утворенню кристалів води всередині клітини, що захищає її органели. При цьому трегалоза є непроникним кріопротектором, який не дозволяє концентрації солі ззовні клітини значно збільшитись при заморожуванні, що забезпечує частковий захист клітини. Це поєднання дозволило значно знизити концентрацію ДМСО, що однозначно допоможе зменшити його можливу негативну дію.

У подальшому наші дослідження будуть направлені на заміну ЕТС, яка використовується в експериментальних роботах, на аутологічну, або принаймні алогенну, а не ксеногенну субстанцію.

ВИСНОВКИ

1. ММСК пуповини людини, кріоконсервовані в кріосередовищах різного складу, після розморожування відрізняються за показниками життєздатності, здатністю до адгезії, експансії і формування моношару.
2. За даними морфологічних досліджень та аналізу динаміки росту кріоконсервованих ММСК пуповини людини з досліджуваних кріосередовищ найбільш ефективною для збереження життєздатності клітин, їх здатності до проліферації і утворення моношару є комбінація з 4 % ДМСО + 6 % трегалози + 90 % ЕТС.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pichkur L. D., Verbovs'ka S. A., Akinola S. T., Chitaeva G. E. Basic pathogenetic mechanisms of demyelination in the central nervous system and its correction limitations. Ukrainian Neurological Journal. 2017. 2. P. 12-19. http://www.ukrneuroj.com.ua/svzhij_nomer.php?nid=43.
2. Maslova O., Novak M., Kruzliak P. Umbilical cord tissue-derived cells as therapeutic agents. Stem Cells International. 2015. 2015. P. 1-10. DOI:10.1155/2015/150609.
3. Vangness C. T., Sternberg H., Harris L. Umbilical cord tissue offers the greatest number of harvestable mesenchymal stem cells for research and clinical application: a literature review of different harvest sites. Arthroscopy. 2015. 31, № 9. P. 1836-1843. DOI:10.1016/j.arthro.2015.03.014.
4. Troyer D. L., Weiss M. L. Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells. 2008. 26, № 3. P. 591-599. DOI:10.1634/stemcells.2007-0439.
5. Fong C. Y., Chak L. L., Biswas A., Tan J. H., Gauthaman K., Chan W. K., et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev. 2011. 7. P. 1-16. DOI:10.1007/s12015-010-9166-x.
6. Vaslovych V. V., Pichkur L. D., Malysheva T. A., Akinola S. T., Verbovska S. A., Toporova O. K., et al. Ultrastructural changes in spinal cord of rats with experimental allergic encephalomyelitis in the background of mesenchymal stem cells and interleukin-10. J Clin Exp Med Res. 2018. 1. P. 17-30. <http://essuir.sumdu.edu.ua/handle/123456789/67929>.

7. Pichkur L. D., Semenova V. M., Verbovska S. A., Oleksenko N. P., Akinola S. T. The features of experimental allergic encephalomyelitis after stem cells transplantation. *Ukrainian Neurosurgical Journal*. 2017. **2**. P. 27-33. DOI: 10.25305/unj.104500.
8. Cohen J. A. Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2013. **333**, № 1-2. P. 43-9. DOI:10.1016/j.jns.2012.12.009.
9. Guo A. C., Chu T., Liu X.Q., Su H. X., Wu W.T. Reactivated astrocytes as a possible source of oligodendrocyte precursors for remyelination in remitting phase of experimental autoimmune encephalomyelitis rats. *Am J Transl Res*. 2016. **8**, № 12. P. 5637-45.
10. Best B. P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res*. 2015. **18**, № 5. P. 422-36. DOI:10.1089/rej.2014.1656.
11. Crowley J. R., Rene A., Valery R. C. The recovery, structure and function of human blood leukocytes after freeze-preservation. *Cryobiology*. 1974. **11**, № 3. P. 395-409. [http://doi.org/10.1016/0011-2240\(74\)90106-0](http://doi.org/10.1016/0011-2240(74)90106-0).
12. Siddiqui M., Parvin R., Giasuddin M., Chowdhury S., Islam M., Chowdhury E. The effect of different concentrations of Dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol as cryoprotectant in preserving Vero cells. *Bangladesh Veterinarian*. 2017. **33**, № 1. P. 1-7. <https://doi.org/10.3329/bvet.v33i1.33307>.
13. Bersenev A. V. Convulsions and coma as complications of DMSO-associated toxicity during infusion of hematopoietic cells in bone marrow transplantation. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2006. **1**. P. 31-32.
14. Balci D., Can A. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Curr. Stem Cell Rep*. 2013. **8**, № 1. P. 60-72. DOI:10.2174/1574888x11308010008.
15. Asghar W., El Assal R., Shafiee H., Anchan R. M., Demirci U. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnol J*. 2014. **9**, № 7. P. 895-903. DOI:10.1002/biot.201300074.
16. Mantri S., Kanungo S., Mohapatra P. Cryoprotective Effect of Disaccharides on Cord Blood Stem Cells with Minimal Use of DMSO. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2014. **31**, № 2. P. 206-212. DOI:10.1007/s12288-014-0352-x.
17. Yong K. W., WanSafwani W. K., Xu F., WanAbas W. A., Choi J. R., Pingguan-Murphy B. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges. *Biopreservation and biobanking*. 2015. **13**, № 4. P. 231-9. DOI:10.1089/bio.2014.0104. PMID: 26280501.
18. Tsybaliu V. I., Pichkur L. D., Deryabina O. G., Maslova O. A., Shuvalova N. S., Verbovska S. A., et al. Phenotypic characteristics and proliferative potential of human mesenchymal stem cells from Wharton jelly during cultivation ex vivo. In: *Aspects of cell cultivation methods in neurobiology and neurooncology*. Edited by Semenova VM. Kyiv: Interservice, 2018. p. 295-304.
19. Roth V. Doubling Time Calculator. 2006. <http://www.doubling-time.com/compute.php>.
20. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. **8**, № 4. P. 315-7. DOI: 10.1080/14653240600855905.
21. Mohammadi Z., Tavakkol Afshari J., Keramati M. R., Hamidi Alamdari D., Ganjibakhsh M., Moradi Zarmehri A., et al. Differentiation of adipocytes and osteocytes from human adipose and placental mesenchymal stem cells. *Iran J Basic Med Sci*. 2015. **18**. P. 259-266.
22. Acharya C., Adesida A., Zajac P., Mumme M., Riesle J., Martin I., et al. Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation. *J Cell Physiol*. 2012. **227**, № 1. P. 88-97. DOI: 10.1002/jcp.22706.
23. Wosnitza M., Hemmrich K., Groger A., Graber S., Pallua N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation*. 2007. **75**. P. 12-23.
24. Kim B. S., Kim J. S., Chung Y. S., Sin Y. W., Ryu K. H., Lee J., et al. Growth and osteogenic differentiation of alveolar human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on chitosan/hydroxyapatite composite fabric. *J Biomed Mater Res A*. 2013. **101**. P. 1550-1558.
25. Gimble J. M., Guilak F., Nuttall M. E., Sathishkumar S. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother*. 2008. **35**. P. 228-238.
26. Кругляков П. В., Польшцев Д. Г., Выйде С. К., Кислякова Т. В. Среда для криоконсервирования мезенхимальных стволовых клеток и биотрансплантат с ее использованием. Описание к Пат. РФ RU2303631C1, пуб. 19.05.2006.
27. Matsumura K., Hayashi F., Nagashima T., Hyon S. H. Long-term cryopreservation of human mesenchymal stem cells using carboxylated poly-L-lysine without the addition of proteins or dimethyl sulfoxide. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2013. **24**, № 12. P. 1484-97.
28. Mamidi M. K., Nathan K. G., Singh G., Thrichelvam S. T., Mohd Yusof N. A. N., Fakharuzi N. A., et al. Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation. *J Cell Biochem*. 2012. **113**, № 3. P. 3153-64.
29. Bahsoun S., Coopman K., Elizabeth C., Akam E. C. The impact of cryopreservation on bone marrow derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *J Transl Med*. 2019. **17**. P. 397. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02136-7>.



СТАТТЯ НА САЙТЕ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори заявили про відсутність потенційного конфлікту інтересів щодо дослідження, авторства та/або публікації даної статті.