

## Влияние криоконсервирования на жизнеспособность, иммунофенотип и дифференцировочные свойства мезенхимальных стромальных клеток ранних стадий органогенеза

UDC 57.043:576.314.4.022

N.A. TRUFANOVA, YU.A. PETRENKO\*, A.YU. PETRENKO

## Effect of Cryopreservation on Viability, Immunophenotype and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cells of Early Organogenetic Stage

Исследовали влияние криоконсервирования путем медленного программного замораживания на жизнеспособность, иммунофенотип и дифференцировочные свойства мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека ранних стадий органогенеза. Показано, что после криоконсервирования под защитой 10%-го диметилсульфоксида (ДМСО), включающего замораживание со скоростью 1°C/мин до -80°C с последующим погружением в жидкий азот, сохранность клеток, оцененная по окрашиванию трипановым синим, составляла 88,4 ± 1,7%. Метаболическая активность клеток, оцененная по восстановлению Alamar Blue, снижалась после криоконсервирования на 15%. Иммунофенотипический анализ MSC 4–12-го пассажей показал, что 95% клеток как до, так и после криоконсервирования экспрессировали маркеры CD29, CD44, CD73 и CD105. Содержание клеток, негативных по маркерам CD34, CD38, CD45, составляло более 95%. После криоконсервирования MSC сохраняют способность к индуцированной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях. Установлено, что медленное замораживание MSC под защитой ДМСО оказывает стимулирующее действие на дифференцировку клеток.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, мезенхимальные стромальные клетки, жизнеспособность, иммунофенотип, дифференцировка.

Досліджували вплив криоконсервування шляхом повільного програмного заморожування на життєздатність, імунофенотип і диференціювальні властивості мезенхімальних стромальних клітин (МСК) ранніх стадій органогенезу. Показано, що після криоконсервування під захистом 10%-го диметилсульфоксиду (ДМСО) зі швидкістю заморожування 1°C/хв до -80°C з подальшим зануренням у рідкий азот, збереженість клітин за забарвленням трипановим синім складала 88,4 ± 1,7%. Метаболічна активність клітин за відновленням Alamar Blue знижувалась після криоконсервування на 15%. Імунофенотипічний аналіз МСК 4–12-го пасаажів показав, що 95% клітин до і після криоконсервування експресували маркери CD29, CD44, CD73, CD105. Вміст клітин, негативних за маркерами CD34, CD38, CD45, складав понад 95%. Після криоконсервування МСК зберігають здатність до індукованого диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках. Встановлено, що повільне заморожування МСК під захистом ДМСО стимулює диференціювання клітин.

**Ключові слова:** криоконсервування, мезенхімальні стромальні клітини, життєздатність, імунофенотип, диференціювання.

The effect of cryopreservation by slow program cooling on the viability, immunophenotypic and differentiative properties of mesenchymal stromal cells (MSCs) of early organogenesis stage was studied. It was shown that after cryopreservation under the protection of 10% dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO) at the cooling rate of 1°C/min down to -80°C with the following plunging into liquid nitrogen the cell viability assessed by trypan blue staining was 88.4 ± 1.7%. The metabolic activity of cells assessed by Alamar Blue reduction assay decreased after cryopreservation by 15%. Immunophenotypic analysis of MSCs after 4–12 passages showed that 95% of cells expressed the markers CD29, CD44, CD73, CD105 prior to and after cryopreservation. The number of CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> and CD45<sup>-</sup> cells was more than 95%. After cryopreservation MSCs maintained their capacity for induced differentiation into osteogenic and adipogenic directions. Slow cooling with Me<sub>2</sub>SO as cryoprotectant was observed to stimulate differentiation of MSCs.

**Key words:** cryopreservation, mesenchymal stromal cells, viability, immunophenotype, differentiation.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются объектом многочисленных исследований в различных областях биологии и медицины. Согласно рекомендациям Международного общества клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy, ISCT) к МСК относят фибробластоподобные клетки, адге-

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are a subject of numerous inquiries in different branches of biology and medicine. According to the recommendations of International Society for Cellular Therapy (ISCT) fibroblast-like cells adherent to plastic and characterized by the specific immunophenotype and multilineal differentiation potential are referred to MSCs [13].

Інститут проблем криобіології і криомедицини  
НАН України, г. Харків

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

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:  
yuripetrenko@cryo.org.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: yuripetrenko@cryo.org.ua

зирующие к пластику и обладающие специфическим иммунофенотипом и мультилинейным дифференцировочным потенциалом [13]. Остеогенный, адипогенный и хондрогенный дифференцировочный потенциалы – это идентификационный признак МСК [9]. Известны сообщения о способности МСК дифференцироваться в кардиомиоциты [10], мышечные [27] и нервные клетки [26], гепатоциты [25]. Высокая пролиферативная активность и мультилинейный дифференцировочный потенциал МСК позволяют использовать их в экспериментальной биологии для получения культур остеобластов, хондроцитов, адипоцитов. Это приобретает особую актуальность, поскольку первичные культуры указанных типов клеток практически невозможно поддерживать. Способность МСК к мультипотентной дифференцировке определяет перспективность их использования в регенеративной медицине. Эффективность применения МСК отмечена для лечения ожоговых поражений [5], неврологических заболеваний [26], инфаркта миокарда [16]. Кроме того, МСК представляют практический интерес как клеточный материал для создания тканеинженерных конструкций. Полученные из МСК остеобласты и хондроциты используют для тканеинженерной реконструкции костных и хрящевых дефектов [18], а преадипоциты – для создания аналогов жировой ткани [7].

Мезенхимальные стромальные клетки получают из стромы ряда тканей взрослых доноров [2, 3, 21, 23,]. Кроме того, имеются сообщения о выделении МСК из эмбриональных/фетальных тканей [6, 14]. Особенность МСК онтогенетически раннего происхождения – высокий пролиферативный потенциал и пластичность по сравнению с МСК взрослого организма [11].

Получение МСК для экспериментальных и клинических целей, как правило, включает ряд этапов: накопление клеточного материала, определение его безопасности (отсутствие патогенных вирусов и бактерий), транспортировка и др. На каждом этапе используют криоконсервирование. В связи с этим актуальными являются вопросы влияния криоконсервирования на морфофункциональные свойства МСК. Для криоконсервирования МСК, полученных из различных источников, широко применяют замораживание со скоростью 1°C/мин до –80°C с последующим погружением в жидкий азот или без погружения в азот, в качестве криозащитных сред используют среды с 5–10% диметилсульфоксидом (ДМСО) и сывороткой [8, 19]. В то же время влияние криоконсервирования на функциональные свойства МСК ранних сроков органогенеза, в том числе на дифференцировочный потенциал, не изучали.

Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation potentials are an identification feature of MSCs [9]. The ability of MSC to differentiate into cardiomyocytes [10], myocytes [27], nerve cells [26] and hepatocytes [25] is reported. High proliferative activity and multilineage differentiation potential allow using MSCs in experimental biology to obtain osteoblast, chondrocyte and adipocyte cultures. This is of special importance, since primary cultures of these cells are practically impossible to sustain. The multilineage differentiation potential of MSCs determines prospects for their application in regenerative medicine. Efficiency of MSCs application was reported in treatment of burn wounds [5], neurologic diseases [26], myocardial infarction [16]. Besides, MSCs are of practical interest as cell material for creation of tissue-engineered constructions. Osteoblasts and chondrocytes obtained from MSCs are used for tissue-engineered reconstruction of bone and cartilage defects [18], and preadipocytes for creation of adipose tissue analogues [7].

Mesenchymal stromal cells are isolated from stroma of some adult donors' tissues [2, 3, 21, 23]. Besides, there are reports on isolation of MSCs from embryonic/ fetal tissues [6, 14]. A peculiarity of MSCs of ontogenetically early origin is a higher proliferative potential and plasticity in comparison with an adult organism's MSCs [11].

Obtaining the MSCs for experimental and clinical purposes, as a rule, includes several stages: accumulation of cell material, estimation of its safety (absence of pathogenic viruses and bacteria), transportation *etc.* Cryopreservation is used at each stage. In this respect issues on cryopreservation influence on morpho-functional properties of MSCs are vital. Freezing at the rate of 1°C/min down to –80°C with the following plunging into liquid nitrogen or without it is widely applied for cryopreservation of MSCs; media containing 5–10% dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO) and serum are used as cryoprotective media [8, 19]. At the same time the effect of cryopreservation on functional properties of MSCs of early organogenesis terms, including on differentiation potential, remains unstudied.

The aim of this study was to investigate the effect of cryopreservation using slow programmable freezing under protection of Me<sub>2</sub>SO on viability, immunophenotype and differentiation properties of human MSCs of early organogenesis stage.

### Materials and methods

The subject of inquiry was human MSCs of early organogenesis stage after 4–12 passages. To obtain the primary cell culture we used the method of cultivation of tissue explants and applied the modified non-enzymatic method for partial disaggregation of tissue fragments [2]. Tissue fragments of human embryos of

Цель работы – исследовать влияние криоконсервирования путем медленного программного замораживания под защитой ДМСО на жизнеспособность, иммунофенотип и дифференцировочные свойства МСК человека ранних стадий органогенеза.

### Материалы и методы

Объектом исследования были МСК человека ранних стадий органогенеза 4–12-го пассажей. Для получения первичной культуры клеток использовали метод культивирования тканевых эксплантатов, для частичной дезагрегации фрагментов ткани применяли модифицированный ферментативный метод [2]. В работе были использованы фрагменты тканей эмбрионов человека 5–6 недель гестации, полученных после искусственного прерывания беременности с письменного согласия проинформированных доноров в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации по проведению биомедицинских исследований и нормами комиссии по биоэтике ИПКиК НАН Украины. Суспензию тканевых фрагментов и клеток культивировали в среде  $\alpha$ -MEM (Sigma, США), дополненной 15% сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота (ЭС, ООО “БиолоТ”, Россия), 100 ед пенициллина, 100 мкг стрептомицина, при 37°C и 95%-й влажности в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. По достижении культурой 60–70% конfluence клетки пересевали с коэффициентом 1:2 в среду  $\alpha$ -MEM с 10% ЭС.

Для криоконсервирования МСК путем медленного охлаждения к суспензии клеток в среде культивирования по каплям добавляли равный объем среды 199 (ПанЭко, Россия), содержащей 20% ДМСО и 40% ЭС, и после эквilibрации в течение 15 мин при температуре 4°C охлаждали в криобирках Corning со скоростью 1°C/мин до –80°C, а затем переносили в жидкий азот и хранили при –196°C не менее 3-х месяцев. Отогрев проводили на водяной бане при 37°C. Для удаления криопротектора деконсервированную суспензию медленно разводили средой 199 с 10% ЭС в соотношении 1:10 с последующим центрифугированием при 200 g в течение 10 мин.

Сохранность клеток определяли по окрашиванию витальным красителем трипановым синим [22], метаболическую активность клеток – по Alamar Blue – тесту (AB-тесту) (Serotec Ltd, США) [20] и выражали в условных единицах флуоресценции (УЕФ). При иммунофенотипическом анализе МСК использовали моноклональные антитела CD29-PE, CD45-PE, CD105-FITC (Serotec Ltd, США), CD34 Class II-FITC, CD 38-RPE (DAKO, Голландия), CD44-FITC, CD73-PE (BD Biosciences). Суспензию клеток 4–12-го пассажей до или

5–6-week gestation obtained after artificial abortion with the informed donors' written consent according to the World Medical Association Declaration of Helsinki on ethical principles for biomedical research and the regulations of the Bioethics Commission of Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine were used in the work. Tissue fragment suspensions and cells were cultivated in 25 cm<sup>2</sup> flasks (Nunc, USA) with  $\alpha$ -MEM medium (Sigma, USA) enriched with 15% fetal calf serum (FCS, BioloT, Russia), 100 units of penicillin and 100 mg of streptomycin at 37°C and 95% humidity in atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub>. After getting 60–70% confluent culture the cells were reseeded in 1:2 ratio in  $\alpha$ -MEM with 10% FCS.

For cryopreservation of MSCs by slow freezing an equal volume of medium 199 (PanEko, Russia) containing 20% Me<sub>2</sub>SO and 40% FCS was added drop by drop to the cell suspension in the culture medium, and after 15 min equilibration at 4°C they were cooled in Corning cryovials at the rate of 1°C/min down to –80°C, plunged into liquid nitrogen and stored at –196°C for not less than 3 months. Thawing was performed in a water bath at 37°C. To remove the cryoprotectant the frozen-thawed suspension was diluted slowly with medium 199 containing 10% FCS in the ratio 1:10 with the following centrifugation at 200 g for 10 min.

Cell integrity was estimated by Trypan blue staining [22]; metabolic activity was assessed by Alamar Blue test (AB-test) (Serotec Ltd, USA) [20] and the data were presented as relative fluorescence units (RFU). Monoclonal antibodies CD29-PE, CD45-PE, CD105-FITC (Serotec Ltd, USA), CD34 Class II-FITC, CD38-RPE (DAKO, Holland), CD44-FITC, CD73-PE (BD Biosciences, USA) were used for immunophenotypic analysis of MSCs. Cell suspension after 4–12 passages prior to and after cryopreservation was stained with the monoclonal antibodies according to the manufacturer's instruction. The control test for anomalous fluorescence of fluorescein isothiocyanate and phycoerythrin was performed with cells subjected to all the procedures except the monoclonal antibody staining. The samples were analyzed on a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). The results of flow cytometry were processed with WinMDI v. 2.8 software and presented as histograms. To determine correctly the percentage of cells expressing the investigated markers the cells with anomalous fluorescence of fluorescein isothiocyanate and phycoerythrin (found when analyzing the non-stained control) were ignored.

Osteogenic and adipogenic potentials of cells were studied in the process of 3 week culturing in media inducing differentiation into the cell lineages above-mentioned. Osteogenic medium comprised  $\alpha$ -MEM, 10% of FCS, 100 nM of dexamethasone, 10 mM of  $\beta$ -



после криоконсервирования окрашивали моноклональными антителами согласно инструкции производителя. Параллельно проводили контроль на аномальное свечение флуоресцеин изотиоцианата и фикоэритрина, осуществляя с клетками все операции, за исключением окрашивания моноклональными антителами. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD Biosciences, США). Результаты проточной цитометрии обрабатывали с помощью программы WinMDI v 2.8 и представляли в виде гистограмм. Для корректного определения процентного содержания клеток, экспрессирующих исследуемые маркеры, клетки с аномальным свечением флуоресцеин изотиоцианата и фикоэритрина (определяли при анализе неокрашенного контроля) не рассматривали.

Остеогенный и адипогенный потенциалы клеток исследовали в процессе культивирования в течение 3-х недель в средах, индуцирующих дифференцировку в указанных направлениях. Остеогенная среда включала  $\alpha$ -MEM, 10% ЭС, 100 нМ дексаметазона, 10 мМ  $\beta$ -глицерофосфата, 0,2 мМ L-аскорбиновой кислоты-2-фосфата (все реактивы – Sigma, США). Адипогенная среда состояла из  $\alpha$ -MEM, дополненной 10% Adipogenic Stimulatory Supplements №05403 (StemCell Inc, Канада). Наличие остеогенной дифференцировки оценивали по экспрессии щелочной фосфатазы с помощью набора Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit №85 (Sigma, США) и по накоплению минерализованного матрикса, выявляемого по окрашиванию ализариновым красным и по методу Ван Косса [1]. Наличие адипогенной дифференцировки оценивали по накоплению в цитоплазме вакуолей, заполненных нейтральными липидами, выявляемыми по окрашиванию Oil Red O. Прижизненную микроскопию, а также анализ окрашенных препаратов культур клеток проводили с использованием инвертированного микроскопа CETI (Голландия), снабженного цифровой камерой Nikon CoolPix 4500.

Для оценки достоверности различий между экспериментальными группами применяли t-критерий Стьюдента, считая достоверными различия с показателем значимости  $p < 0,05$ . Данные представляли как  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – средняя ошибка.

### Результаты и обсуждение

В культурах МСК ранних стадий органогенеза 4–12-го пассажей клеточный слой был представлен клетками с фибробластоподобной морфологией, четко ориентированными в направлении роста. Основная масса клеток характеризовалась небольшими размерами, веретеновидной морфоло-

glycerophosphate, 0.2 mM of L-ascorbic acid 2-phosphate (all the reagent made by Sigma, USA). Adipogenic medium comprised  $\alpha$ -MEM enriched with the Adipogenic Stimulatory Supplements 05403 (StemCell Inc, Canada). Osteogenic differentiation was assessed by alkaline phosphatase expression using Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit 85 (Sigma, USA) and by accumulation of mineralized matrix revealed by Alizarin red stain and by Van Kossa staining [1]. Adipogenic differentiation was assessed by accumulation of cytoplasmic vacuoles filled with neutral lipids revealed by Oil Red O stain. Vital microscopy as well as analysis of stained preparations of cell suspensions were carried out using a CETI inverted-stage microscope (Holland) equipped with Nikon CoolPix 4500 digital camera.

Student's test was applied to assess significance of differences between experimental groups; differences with the significance level of  $p < 0.05$  were considered to be significant. The data are presented as  $M \pm m$ , where  $M$  is the average value, and  $m$  is the standard error.

### Results and discussion

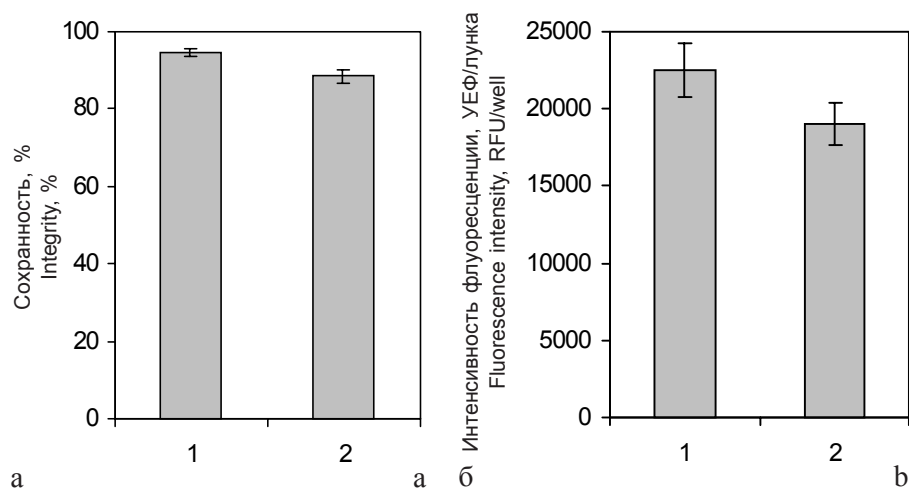
In MSCs cultures of early organogenesis stage from the 4<sup>th</sup>–12<sup>th</sup> passages the cell layers were presented by cells with fibroblast-like morphology, clearly growth-oriented. The bulk of cells were small, spindle-shaped, with high nucleus/cytoplasm ratio and oval elongated nuclei containing 2-3 nucleoli. MSCs after the 4<sup>th</sup>–12<sup>th</sup> passages were subjected to the slow two-step cooling under the protection of 10% Me<sub>2</sub>SO. As Fig. 1a shows the cell integrity estimated by Trypan blue staining made  $94.6 \pm 1.1\%$  and  $88.4 \pm 1.7\%$  prior to and after cryopreservation, respectively. These data agree with the those presented in [7], where the 90% integrity in human bone marrow MSCs after cryopreservation with cooling rate of 1°C/min was shown. Trypan blue staining only allows revealing the severe damages of plasmatic membrane integrity, so such data do not always correlate with cell viability. That is why cryopreservation effect on MSCs viability was also assessed by their metabolic activity in AB-test. The results on the distribution of fluorescence intensity of the reduced form of the AB redox indicator during culturing of MSCs prior to and after cryopreservation are presented in Fig. 1b. It can be seen that the AB fluorescence intensity reflecting total metabolic activity of cells was  $22,500 \pm 1,700$  RFU prior to cryopreservation and  $19,000 \pm 1,400$  RFU after it, that attests to a reduction in the cell metabolic activity by 15%.

MSCs after the 4<sup>th</sup>–12<sup>th</sup> passages prior to and after cryopreservation were immunophenotypically analyzed. As one can see in Fig. 2, about 95% of cells in the cultures studied expressed the markers CD29, CD44, CD73 and CD105. Herewith the content of cells, which

гией, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, овально-вытянутым ядром с 2-3 ядрышками. МСК 4–12-го пассажей были подвергнуты медленному двухэтапному режиму замораживания под защитой 10%-го ДМСО. Сохранность клеток, оцененная по окрашиванию трипановым синим, до криоконсервирования составляла  $94,6 \pm 1,1\%$ , после –  $88,4 \pm 1,7\%$  (рис. 1, а). Эти данные согласуются с результатами

работы [17], в которой показано, что сохранность МСК костного мозга человека после криоконсервирования с помощью замораживания со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  составляет 90%. Определение сохранности с использованием окрашивания трипановым синим позволяет выявить лишь грубые нарушения целостности плазматической мембраны и полученные данные не всегда коррелируют с жизнеспособностью клеток. Поэтому влияние криоконсервирования на жизнеспособность МСК оценивали также по их метаболической активности с помощью АВ-теста. На рис. 1, б представлены результаты определения интенсивности флуоресценции восстановленной формы редокс-индикатора АВ при культивировании МСК до и после криоконсервирования. Как видно, интенсивность флуоресценции АВ, отражающая суммарную метаболическую активность клеток, до криоконсервирования составляла  $22500 \pm 1700$  УЕФ, после криоконсервирования –  $19000 \pm 1400$  УЕФ, что свидетельствует о снижении метаболической активности клеток на 15%.

Проводили иммунофенотипический анализ МСК 4–12-го пассажей до и после криоконсервирования. Как видно из рис. 2, около 95% клеток в исследуемых культурах экспрессировали маркеры CD29, CD44, CD73 и CD105. При этом содержание клеток, негативных по маркерам гемопоэтических клеток CD34, CD38, CD45, составляло более 95%. Следует отметить, что клеточный состав культур МСК ранних стадий органогенеза, оцененный по экспрессии панели поверхностных маркеров, не изменялся в ходе субкультивирования до 12-го пассажа. Приведенные результаты согласуются с данными, полученными при определении иммунофенотипа МСК костного мозга, жировой ткани и кожи взрослого человека [4, 15, 21]. Так, в работе



**Рис. 1.** Сохранность (а) и интенсивность флуоресценции АВ (б) МСК ранних стадий органогенеза до (1) и после (2) криоконсервирования путем замораживания со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  под защитой 10%-го ДМСО: \* – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значением показателя до криоконсервирования.

**Fig. 1.** Integrity (a) and AB fluorescence intensity (b) of MSCs of early organogetic stage prior to (1) and after (2) cryopreservation utilizing cooling rate of  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  under the protection of 10% DMSO: \* – statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in comparison with the prior-to-cryopreservation value.

were negative by the hemopoietic cell markers CD34, CD38, CD45, was more than 95%. It should be noted that the cell composition of MSCs cultures of early organogenesis stages assessed by the surface markers panel expression did not change in the course of subcultivation till the 12<sup>th</sup> passage. The results presented are in agreement with the data on MSCs phenotypes of adult human bone marrow, adipose tissue and skin [4, 15, 21]. For example, cytofluorometry of bone marrow fibroblast-like cell culture after the 4<sup>th</sup> and the 5<sup>th</sup> passages revealed no expression of the markers CD45, CD19, CD3, CD14, Flk-1 and a positive expression of Sca-1, CD105 and CD29 by these cells [15]. Here CD29<sup>+</sup> cell content was 99% during 5 passages. Pittenger *et al.* [21] showed that as early as in the bone marrow mononuclear primary culture an increase in the relative content of CD73<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells was observed from the 5<sup>th</sup> day of cultivation, and this phenotype dominated during the further cultivation till the 12<sup>th</sup> passage.

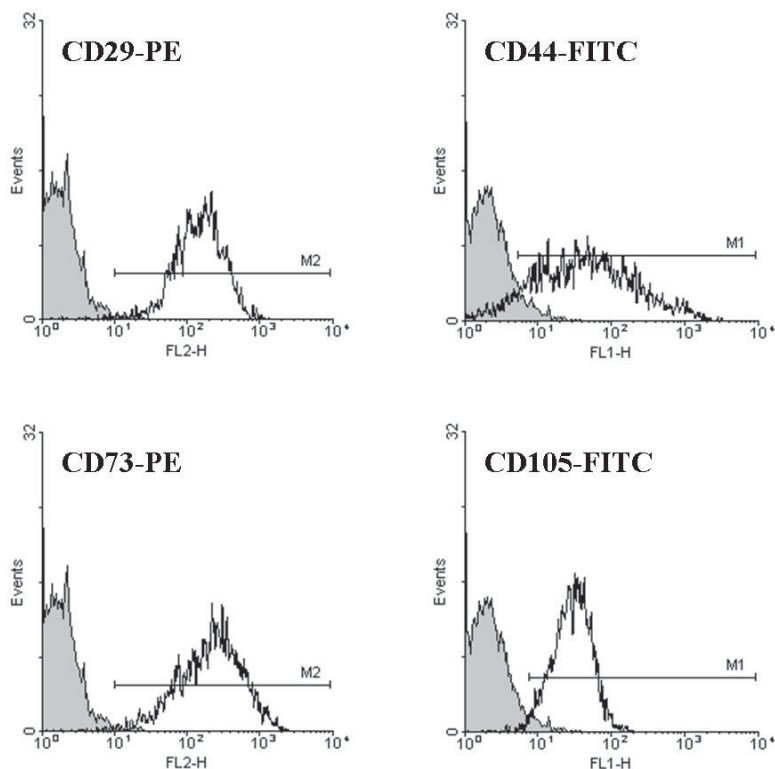
Human MSCs of early organogenesis stage were also immunophenotypically analyzed after cryopreservation. According to the cytofluorometric data no changes were registered in the frozen-thawed MSCs phenotypes. More than 95% of cells in the cultures analyzed were presented by cells positive by CD29, CD44, CD73 and CD105, and negative by CD34, CD38 and CD45 antigens. These results conform to the data obtained in other types of MSCs. For example, in the work [12] the human bone marrow MSCs had the same immunophenotype and proliferative potential after cryopreservation as the control cells.

[15] при цитофлуориметрическом анализе 4 и 5-го пассажей культуры фибробластоподобных клеток, выделенных из костного мозга, отмечены отсутствие экспрессии этими клетками маркеров CD45, CD19, CD3, CD14, Flk-1 и позитивная экспрессия Sca-1, CD105 и CD29. При этом содержание CD29<sup>+</sup>-клеток составляло 99% на протяжении 5 пассажей. Pittenger с соавторами [21] показали, что уже в первичной культуре мононуклеаров костного мозга, начиная с 5-х суток культивирования, наблюдалось увеличение относительного содержания CD73<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>-клеток, и данный фенотип преобладал при последующем культивировании до 12-го пассажа.

Имунофенотипический анализ МСК человека ранних стадий органогенеза был проведен также после криоконсервирования. Согласно полученным цитофлуориметрическим данным иммунофенотип деконсервированных МСК не изменялся. Более 95% клеток в анализируемых суспензиях были представлены клетками позитивными по CD29, CD44, CD73, CD105 и негативными по CD34, CD38, CD45. Эти результаты согласуются с данными, полученными на других типах МСК. Так, в работе [12] МСК, изолированные из костного мозга человека, после криоконсервирования обладали таким же иммунофенотипом и пролиферативным потенциалом, как и клетки контрольной группы.

Поскольку влияние криоконсервирования на дифференцировочный потенциал МСК изучено недостаточно, особый интерес представляли исследования остеогенных и адипогенных дифференцировочных потенциалов МСК человека ранних стадий органогенеза после медленного замораживания под защитой 10%-го ДМСО.

Результаты, полученные при оценке наличия остеогенной дифференцировки в культурах МСК ранних стадий органогенеза до и после криоконсервирования, представлены в табл. 1. При культивировании в остеогенной среде МСК до криоконсервирования наблюдали экспрессию щелочной фосфатазы и накопление минерализованного матрикса. При этом в контроле на спонтанную дифференцировку после 3-х недель культивирования в среде без специфических добавок, индуцирующих остеогенез, экспрессия щелочной фосфатазы и отложение минерализованного матрикса не выявлялись.



**Рис. 2.** Иммунофенотипический анализ МСК человека ранних стадий органогенеза, проведенный методом проточной цитофлуориметрии: серый цвет – неокрашенный контроль; белый – окрашивание соответствующим маркером.

**Fig. 2.** Immunophenotypic analysis of human MSCs of early organogenetic stages performed by flow cytometry: grey area represents non-stained control; white area shows the staining with the corresponding marker.

Since cryopreservation influence on MSC differentiation potential is studied insufficiently, the insights into osteogenic and adipogenic differentiation potentials of human MSCs of early organogenesis stage after slow freezing under the protection of 10% were of great interest.

The results of the assessment of osteogenic differentiation in MSCs cultures of early organogenesis stage prior to and after cryopreservation are presented in Table 1. Alkaline phosphatase expression and mineralized matrix accumulation were observed when MSCs were cultivated in the osteogenic medium prior to cryopreservation. Herewith when spontaneous differentiation was monitored after 3 week cultivation in medium without specific osteogenesis-inducing additives, there was neither alkaline phosphatase expression nor mineralized matrix accumulation. When MSCs cryopreserved by slow freezing were placed into the medium with specific inducers of osteogenic differentiation, alkaline phosphatase expression was observed as early as 3 weeks after the beginning of cultivation. A positive staining for this marker was also registered in the control to spontaneous differentiation, though it was less conspicuous than that in wells after osteogenic induction. Beginning with the 2<sup>nd</sup> week of culti-



**Таблица 1.** Влияние криоконсервирования под защитой 10%-го ДМСО на остеогенные свойства МСК ранних стадий органогенеза

**Table 1.** Influence of cryopreservation under the protection of 10% Me<sub>2</sub>SO on osteogenic properties of MSCs of early organogenetic stages

Группа Group	Контроль на спонтанную дифференцировку Control to spontaneous differentiation		Остеогенная индукция Osteogenic induction	
	Экспрессия щелочной фосфатазы Alkaline phosphatase expression	Минерализация экстраклеточного матрикса Mineralization of extracellular matrix	Экспрессия щелочной фосфатазы Alkaline phosphatase expression	Минерализация экстраклеточного матрикса Mineralization of extracellular matrix
До криоконсервирования Prior to cryopreservation	–	–	+	+
После криоконсервирования After cryopreservation	±	–	+	+

**Примечание:** “+” – признак отчетливо выражен; “±” – признак слабо выражен; “–” – признак отсутствует.  
**Note:** “+” – clearly manifested sign; “±” – slightly manifested sign; “–” – no sign.

При помещении МСК, криоконсервированных путем медленного замораживания, в среду со специфическими индукторами остеогенной дифференцировки экспрессия щелочной фосфатазы выявлялась через 3 недели культивирования. В контроле на спонтанную дифференцировку также отмечали окрашивание на этот маркер, хотя оно было менее выражено по сравнению с окрашиванием в лунках после остеогенной индукции. Начиная со 2-й недели культивирования деконсервированных МСК в остеогенной среде, наблюдали накопление экстраклеточного матрикса. Выявление солей кальция окрашиванием ализариновым красным и серебрением по Ван Коссу после 3-х недель культивирования подтвердило предположение о характерной для остеогенной дифференцировки минерализации матрикса. В контроле на спонтанную дифференцировку отложения минерализованного матрикса не наблюдали.

Результаты, полученные при оценке наличия адипогенной дифференцировки в культурах МСК ранних стадий органогенеза до и после криоконсервирования, представлены в табл. 2. При культивировании МСК до криоконсервирования в адипогенной среде на 3-й неделе появлялись клетки округлой формы с вакуолями, содержащими нейтральные липиды и позитивные по Oil Red O. В контроле на спонтанную дифференцировку после культивирования в среде без индукторов адипогенеза клетки, позитивные по Oil Red O, не выявлялись. При культивировании в течение 3-х недель деконсервированных МСК как среде с индукторами адипогенной дифференцировки, так и при их отсутствии,

при помещении МСК в остеогенную среду накопление экстраклеточного матрикса было замечено. Ализариновое и Ван Косса окрашивание после 3 недель культивирования подтвердило предположение о типичной для остеогенной дифференцировки минерализации матрикса. В контроле на спонтанную дифференцировку отложения минерализованного матрикса не наблюдали.

Результаты оценки адипогенной дифференцировки в культурах МСК ранних стадий органогенеза до и после криоконсервирования представлены в табл. 2. Круглые клетки с вакуолями, содержащими нейтральные липиды, появились на 3-й неделе культивирования МСК до криоконсервирования в адипогенной среде. При спонтанной дифференциации в среде без адипогенных индукторов, не было выявлено позитивных клеток Oil Red O. При 3-недельном культивировании МСК после криоконсервирования в адипогенной среде, были выявлены клетки, позитивные по Oil Red O.

**Таблица 2.** Влияние криоконсервирования под защитой 10%-го ДМСО на адипогенные свойства МСК ранних стадий органогенеза  
**Table 2.** Influence of cryopreservation under the protection of 10% on adipogenic properties of MSCs of early organogenetic stage

Группа Group	Наличие позитивных по Oil Red O клеток Occurrence of Oil Red O positive cell	
	Контроль на спонтанную дифференцировку Control to spontaneous differentiation	Адипогенная индукция Adipogenic induction
До криоконсервирования Prior to cryopreservation	–	+
После криоконсервирования After cryopreservation	±	+

**Примечание:** “+” – признак отчетливо выражен; “±” – признак слабо выражен; “–” – признак отсутствует.  
**Note:** “+” – clearly manifested sign; “±” – slightly manifested sign; “–” – no sign.

наблюдали появление клеток, накапливающих нейтральные липиды в составе вакуолей. В то же время количество позитивных по Oil Red O клеток в контроле на спонтанную дифференцировку было меньше, чем после специфической индукции.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что МСК человека ранних стадий органогенеза после криоконсервирования сохраняют способность к индуцированной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях. Полученные результаты также показали, что медленное замораживание МСК под защитой ДМСО оказывает стимулирующее действие на дифференцировку в адипогенном и остеогенном направлениях. Стимулирующий эффект в отношении остеогенной дифференцировки может быть обусловлен действием ДМСО, который является неспецифическим индуктором дифференцировки. Так, в работе [24] показано, что после экспозиции первичной суспензии клеток эмбриональной печени человека с 0,7 М ДМСО в течение 30 мин при 4°C при последующем культивировании наблюдается более активная остеогенная дифференцировка фибробластоподобных клеток, выделенных из этой суспензии, по сравнению с нативным контролем. Показано [17], что деконсервированные МСК костного мозга сохраняют остеогенный потенциал, а при долгосрочном хранении (более 3-х лет) МСК проявляют более интенсивные остеогенные свойства.

## Выводы

Криоконсервирование под защитой 10%-го ДМСО, включающее медленное замораживание со скоростью 1°C/мин, позволяет в значительной степени сохранить жизнеспособность, метаболическую активность и способность к индуцированной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях МСК человека ранних стадий органогенеза. Кроме того, медленное замораживание МСК под защитой ДМСО оказывает стимулирующее действие на дифференцировку в адипогенном и остеогенном направлениях.

## Литература

1. *Кисели Д.* Практическая микротехника и гистохимия.– Будапешт: Изд-во Академии наук Венгрии.– 1962.– 399 с.
2. *Петренко А.Ю., Мазур С.П., Петренко Ю.А. и др.* Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // *Трансплантология*.– 2007.– Т.9, №1.– С.218–220.
3. *Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г. и др.* Стромальные клетки-предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании // *Журнал Академії медичних наук України*.– 2008.– Т. 14, №2.– С. 354–365.

the media both with adipogenic differentiation inducers and without them, cells with vacuoles containing neutral lipids were found. At the same time the number of Oil Red O positive cells in the control to spontaneous differentiation was lower than that after the specific induction.

Thus the investigation performed attests to the fact that human MSCs of early organogenesis stages maintain capacity for induced differentiation into osteogenic and adipogenic lineages after cryopreservation. The data obtained also showed that slow freezing of MSCs protected by Me<sub>2</sub>SO exerted a stimulating effect on differentiation into in adipogenic and osteogenic directions. The stimulating effect towards osteogenic differentiation can be attributed to the influence of Me<sub>2</sub>SO, which is a non-specific inducer of differentiation. For example, it was demonstrated [24] that after 30 min exposure of the primary suspension of human embryonic liver cells to 0.7 M Me<sub>2</sub>SO at 4°C more active osteogenic differentiation of fibroblast-like cells isolated from this suspension was observed in comparison with the native control. It was discovered [17] that frozen-thawed bone marrow MSCs maintained their osteogenic potential, and showed more intensive osteogenic properties after long-term (more than 3 years) storage.

## Conclusions

Cryopreservation by slow freezing at the rate of 1°C/min under the protection of 10% Me<sub>2</sub>SO provides considerable maintenance of viability, metabolic activity and capacity for induced differentiation in osteogenic and adipogenic lineages of human MSCs of early organogenesis stages. Besides, slow freezing MSCs protected by Me<sub>2</sub>SO exerted the stimulating effect on differentiation in osteogenic and adipogenic directions.

## References

1. *Kiszely D.* Practical microtechniques and histochemistry.– Budapest: Edition of Academy of Sciences of Hungary.– 1962.– 399 p.
2. *Petrenko A.Yu., Mazur S.P., Petrenko Yu.A. et al.* Isolation and multilineal differentiation of stromal cells from human embryos and adults // *Transplantologiya*.– 2007.– Vol. 9, N1.– P. 218–220.
3. *Petrenko A.Yu., Petrenko Yu.A., Skorobogatova N.G. et al.* Stromal cells-precursors of adipose tissue: isolation, phenotypic and differentiative properties upon monolayer cultivation // *Zhurnal Akademii Medychnykh Nauk Ukrainy*.– 2008.– Vol. 14, N2.– P. 354–365.
4. *Petrenko A.Yu., Petrenko Yu.A., Skorobogatova N.G. et al.* Human bone marrow, adipose tissue and skin stromal cells manifest the immunophenotype and differentiation potential of mesenchymal stromal cells // *Transplantologiya*.– 2008.– Vol. 10, N1.– P. 84–86.
5. *Rasulov M.F., Vasilchenkov A.V., Krashennikov M.Ye. et al.* Transplantation of bone marrow stem cells in burn wound treatment // *Pacific Medical Journal*.– 2004.– N4.– P. 32–33.



4. Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г. и др. Стромальные клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии проявляют иммунофенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток // Трансплантология.– 2008.– Т. 10, №1.– С. 84–86.
5. Расулов М.Ф., Васильченко А.В., Крашенинников М.Е. и др. Трансплантация стволовых клеток костного мозга в лечении ожоговых ран // Тихоокеанский мед. журнал.– 2004.– №4.– П. 32–33.
6. Скоробогатова Н.Г., Волкова Н.А., Петренко А.Ю. Остеогенные и адипогенные свойства фибробластоподобных клеток-предшественников фетальной печени человека // Цитология.– 2008.– Т. 50, №4.– С. 317–322.
7. Alhadlaq A., Tang M., Mao J.J. Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: implications in soft tissue augmentation and reconstruction // Tissue Eng.– 2005.– Vol. 11, N3-4.– P. 556–566.
8. Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M. et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2000.– Vol. 97, N7.– P. 3213–3218.
9. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy.– 2006.– Vol. 8, N4.– P. 315–317.
10. Fukuda K. Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy // Human Cell.– 2003.– Vol. 16, N3.– P. 83–94.
11. Gotherstrom C., West A., Liden J. et al. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells // Haematologica.– 2005.– Vol. 90, N8.– P. 1017–1026.
12. Haack-Sorensen M., Bindslev L., Mortensen S. et al. The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use // Cytotherapy.– 2007.– Vol. 9, N4.– P. 328–337.
13. Horwitz E., Le B.K., Dominici M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy.– 2005.– Vol. 7, N5.– P. 393–395.
14. In't Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A. et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential // Haematologica.– 2003.– Vol. 88, N8.– P. 845–852.
15. Ip J.E., Wu Y., Huang J. et al. Mesenchymal stem cells use integrin  $\alpha 1$  not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment // Mol. Biol. Cell.– 2007.– Vol. 18, N8.– P. 2873–2882.
16. Itescu S., Kocher A.A., Schuster M.D. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function // Ann. Hematol.– 2002.– Vol. 81, Suppl. 2.– P. S21–S25.
17. Kotobuki N., Hirose M., Machida H. et al. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells // Tissue Eng.– 2005.– Vol. 11, N5-6.– P. 663–673.
18. Liu B.L., McGrath J., McCabe L. et al. Response of murine osteoblasts and porous hydroxyapatite scaffolds to two-step, slow freezing and vitrification processes// Cell Preservation Technology.– 2002.– Vol. 1, N1.– P. 33–44.
19. Lucas P.A., Calcutt A.F., Southerland S.S. et al. A population of cells resident within embryonic and newborn rat skeletal muscle is capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes // Wound Repair Regen.– 1995.– Vol. 3, N4.– P. 449–460.
20. O'Brien J., Wilson I., Orton T. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of
21. Skorobogatova N.G., Volkova N.A., Petrenko A.Yu. Osteogenic and adipogenic capacity of fibroblast-like progenitor cells derived from human fetal liver // Tsitologiya.– 2008.– Vol. 50, N4.– P. 317–322.
22. Alhadlaq A., Tang M., Mao J.J. Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: implications in soft tissue augmentation and reconstruction // Tissue Eng.– 2005.– Vol. 11, N3-4.– P. 556–566.
23. Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M. et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2000.– Vol. 97, N7.– P. 3213–3218.
24. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy.– 2006.– Vol. 8, N4.– P. 315–317.
25. Fukuda K. Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy // Human Cell.– 2003.– Vol. 16, N3.– P. 83–94.
26. Gotherstrom C., West A., Liden J. et al. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells // Haematologica.– 2005.– Vol. 90, N8.– P. 1017–1026.
27. Haack-Sorensen M., Bindslev L., Mortensen S. et al. The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use // Cytotherapy.– 2007.– Vol. 9, N4.– P. 328–337.
28. Horwitz E., Le B.K., Dominici M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy.– 2005.– Vol. 7, N5.– P. 393–395.
29. In't Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A. et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential // Haematologica.– 2003.– Vol. 88, N8.– P. 845–852.
30. Ip J.E., Wu Y., Huang J. et al. Mesenchymal stem cells use integrin  $\alpha 1$  not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment // Mol. Biol. Cell.– 2007.– Vol. 18, N8.– P. 2873–2882.
31. Itescu S., Kocher A.A., Schuster M.D. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function // Ann. Hematol.– 2002.– Vol. 81, Suppl. 2.– P. S21–S25.
32. Kotobuki N., Hirose M., Machida H. et al. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells // Tissue Eng.– 2005.– Vol. 11, N5-6.– P. 663–673.
33. Liu B.L., McGrath J., McCabe L. et al. Response of murine osteoblasts and porous hydroxyapatite scaffolds to two-step, slow freezing and vitrification processes// Cell Preservation Technology.– 2002.– Vol. 1, N1.– P. 33–44.
34. Lucas P.A., Calcutt A.F., Southerland S.S. et al. A population of cells resident within embryonic and newborn rat skeletal muscle is capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes // Wound Repair Regen.– 1995.– Vol. 3, N4.– P. 449–460.
35. O'Brien J., Wilson I., Orton T. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of

- mammalian cell cytotoxicity // Eur. J. Biochem.– 2000.– Vol. 267, N17.– P. 5421–5426.
21. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science.– 1999.– Vol. 284, N5411.– P. 143–147.
  22. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell. Biol.– 1976.– Vol. 13.– P. 29–83.
  23. Shih D.T., Lee D.C., Chen S.C. et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue // Stem Cells.– 2005.– Vol. 23, N7.– P. 1012–1020.
  24. Skorobogatova N.G., Volkova N.A., Petrenko A.Y. The influence of cryoprotectant Me<sub>2</sub>SO on differentiation capacity of stromal stem/progenitor cells derived from human fetal liver // Cryobiology.– 2007.– Vol. 55, N3.– P. 366.
  25. Wang P.P., Wang J.H., Yan Z.P. et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2004.– Vol. 320, N3.– P. 712–716.
  26. Yang L.Y., Huang T.H., Ma L. Bone marrow stromal cells express neural phenotypes in vitro and migrate in brain after transplantation *in vivo* // Biomed. Environ. Sci.– 2006.– Vol. 19, N5.– P. 329–335.
  27. Young H.Y., Steele T.A., Bray R. et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors // Anat. Rec.– 2001.– Vol. 264, N1.– P. 51–64.
  24. Skorobogatova N.G., Volkova N.A., Petrenko A.Y. The influence of cryoprotectant Me<sub>2</sub>SO on differentiation capacity of stromal stem/progenitor cells derived from human fetal liver // Cryobiology.– 2007.– Vol. 55, N3.– P. 366.
  25. Wang P.P., Wang J.H., Yan Z.P. et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2004.– Vol. 320, N3.– P. 712–716.
  26. Yang L.Y., Huang T.H., Ma L. Bone marrow stromal cells express neural phenotypes in vitro and migrate in brain after transplantation *in vivo* // Biomed. Environ. Sci.– 2006.– Vol. 19, N5.– P. 329–335.
  27. Young H.Y., Steele T.A., Bray R. et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors // Anat. Rec.– 2001.– Vol. 264, N1.– P. 51–64.

*Accepted in 12.01.2010*

*Поступила 12.01.2010  
Рецензент Е.И. Гончарук*