



Исайкина Я.И., Лях Е.Г., Савич Ю.В.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Функциональные свойства мезенхимальных стволовых клеток плаценты, депонированных для клинического применения после продолжительной экспансии и криозамораживания

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Исайкина Я.И. – разработка концепции и дизайна исследования, проведение анализа и интерпретации полученных результатов, написание статьи; Лях Е.Г. – осуществление этапа исследования по получению биологического материала для эксперимента и его проведение, а также сбор результатов для написания оригинальной статьи; Савич Ю.В. – внесение существенного вклада в получение данных для написания оригинальной статьи.

Подана: 10.08.2022

Принята: 12.09.2022

Контакты: yaninai@mail.ru, lyakchelena@gmail.com, julia90pekhota@tut.by

Резюме

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) все шире применяются в клинической практике. Преимущество МСК плаценты в том, что они более молодые и обладают высоким пролиферативным потенциалом, что позволяет заготавливать клеточный продукт на протяжении всего периода их экспансии *in vitro* и депонировать в крио-банке для применения по первому требованию. Нашей целью являлось исследование жизнеспособности (ЖСП) и пролиферативной активности МСК плаценты после криозамораживания в зависимости от продолжительности культивирования клеток. МСК выделяли из фрагментов децидуальной ткани, ворсин хориона и амниона коллагеназой I, культивировали с проведением 7 пассажей. Клетки каждого пассажа в 5%-ном альбумине с 10%-ным ДМСО замораживали с использованием программируемого замораживателя и хранили при -196°C не менее 4 месяцев. Образцы МСК разных пассажей размораживали, культивировали до 7-го пассажа включительно, оценивали ЖСП и коэффициент популяционного удвоения (ПУ) и сравнивали с ПУ нативных МСК аналогичного пассажа. Результаты показали, что ЖСП МСК после замораживания/оттаивания составляла $81 \pm 9,5\%$, но была ниже на всех пассажах по сравнению с нативными МСК ($93 \pm 1\%$) ($p < 0,05$). ЖСП размороженных клеток разных пассажей была сопоставима, то есть количество манипуляций с клетками не влияло на их способность проходить критические точки замораживания/оттаивания. ПУ во всех пробах размороженных МСК из различных частей плаценты не различалось на 2–4-м пассажах, но снижалось к 6-му, 7-му пассажам ($p < 0,05$). Кумулятивное ПУ интактных и размороженных МСК не различалось: у нативных МСК после 2-го пассажа оно составляло $22,8 \pm 2,5$ и к 7-му увеличивалось до $38,3 \pm 3,2$, а у размороженных МСК с $22,02 \pm 0,4$ после 2-го пассажа повышалось до $33,4 \pm 2,4$ после 7-го. Нами сделано



заключение о том, что депонированные при сверхнизкой температуре для клинического применения МСК плаценты сохраняют жизнеспособность и обладают высоким пролиферативным потенциалом, сопоставимым с нативными МСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, плацента, криоаморазивание, популяционное удвоение, жизнеспособность, пролиферация

Isaikina Y., Liakh E., Savich Y.

Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Functional Characteristics of Clinical Placental Mesenchymal Stem Cell after Continuous Passaging and Cryopreservation

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Isaikina Y. – development of the concept and design of the study, analysis and interpretation of the results obtained, writing the article; Liakh E. – implementation of the research stage to obtain biological material for the experiment and its conduct, as well as the collection of results for writing the original article; Savich Y. – making a significant contribution to obtaining data for writing the original article.

Submitted: 10.08.2022

Accepted: 12.09.2022

Contacts: yaninai@mail.ru, lyachelena@gmail.com, julia90pekhota@tut.by

Abstract

Recently, MSCs have been widely used for immunosuppressive and regenerative therapy. MSCs derived from the placenta tissue are preferred for this purpose, since they have a high ability to proliferate and differentiate. Creating a biobank of these cells allows using them as needed. The purpose of this study was to evaluate the safety of viability and proliferative potential of placental MSCs after freezing and cryostorage in a biobank. MSCs isolated from the decidua, chorion, and amnion of the placenta were expanded for 7 passages. Cells from different passages were frozen and stored in a biobank at -196°C for more than 4 months. The viability and population doubling (PD) of the MSCs after cryopreservation compared with these parameters of native MSCs. The PD calculated based on the number of cells seeded and harvested at each passage. Our results showed that the viability MSCs for each passage post thawing remained high ($81\pm 9.5\%$), but was lower than before freezing ($93\pm 1\%$) ($p<0.05$). Viability of thawed MSCs was comparable at all passages and the PD was the same at passages 2–4, but decreased by passages 6–7 ($p<0.05$). The cumulative PD of both thawed MSCs and native MSCs did not differ during cultivation from 2 to 7 passages. We demonstrated that cryopreservation and thawing of placental MSCs does not lead to a decrease of viability and proliferative capacity, regardless of the period of cultivation and the number of cell subcultures.

Keywords: mesenchymal stem cells, placenta, cryopreservation, population doubling, viability, proliferative potential

■ ВВЕДЕНИЕ

Использование иммуносупрессивного и противовоспалительного потенциала мезенхимальных стволовых клеток (МСК) с терапевтической целью доказало свою эффективность при лечении реакции «трансплантат против хозяина», таких аутоиммунных заболеваний, как системная красная волчанка, синдром Шегрена, болезнь Крона и др. Это напрямую связано со способностью МСК модулировать иммунный ответ *in vivo* путем секреции таких медиаторов, как индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), простагландин E2 (PGE2), которые ингибируют пролиферацию и активацию Т-лимфоцитов, а также путем непосредственного взаимодействия МСК с иммунными клетками, приводящего к анергии последних. Однако для получения устойчивого терапевтического ответа иногда требуется высокая кумулятивная доза МСК и увеличение кратности введения клеток до 4 и более раз [1]. Технологии выделения и экспансии МСК из ткани плаценты являются последними разработками в области стволовых клеток. Плацента и пуповина – самые гестационно молодые источники МСК, они обладают высоким пролиферативным потенциалом и пластичностью, что делает их наиболее перспективными для использования в клеточной терапии и тканевой инженерии.

Банкирование аллогенных МСК плаценты позволит решить проблему применения этих клеток по первому требованию и в любом количестве, обеспечивающем проведение эффективного лечения пациентов различных возрастных групп. Существует два основных способа хранения: замораживание измельченных фрагментов плаценты с последующим выделением МСК после размораживания методом эксплантов и ферментативная обработка ткани, приводящая к диссоциации клеток плаценты, среди которых находятся МСК, и замораживание взвеси клеток плаценты для последующей экспансии после криохранения и оттаивания. Каждый из способов имеет свои недостатки. Так, при замораживании измельченных фрагментов происходит поглощение диметилсульфоксида (ДМСО) тканью, что приводит к сохранению криопротектора в ней при размораживании и гибели МСК, при этом сохраняется их жизнеспособность на уровне всего 10%. Ферментативный метод хотя и позволяет после оттаивания получить более 80% жизнеспособных клеток, но само содержание МСК среди других клеток плаценты очень низкое на каждый грамм ткани [2].

Предложенный нами способ хранения МСК плаценты в криобанке требует проведения криоконсервации МСК, выделенных из ткани плаценты и экспансированных *in vitro* в течение нескольких пассажей. После длительного хранения при сверхнизкой температуре –196 °С и последующего размораживания МСК обязательно культивируют до получения необходимой эффективной массы БМКП МСК, который будет использован для проведения клеточной терапии. Это предполагает воздействие на культивированные клетки криопротектора диметилсульфоксида, а также прохождение ими критических температурных точек во время этапа замораживания и размораживания. Поэтому вопрос о влиянии процесса криозамораживания на жизнеспособность клеток и на морфофункциональные свойства МСК до сих пор является актуальным. Так как МСК плаценты имеют значительно более высокий пролиферативный потенциал, чем МСК костного мозга и жировой ткани, важным является исследование сохранности этого потенциала для получения многоклеточного терапевтически эффективного БМКП после размораживания.



■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить влияние продолжительности экспансии мезенхимальных стволовых клеток плаценты *in vitro* и воздействия сверхнизкой температуры на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток, депонированных в криобанке для проведения клеточной терапии пациентам.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МСК выделяли ферментативным методом из фрагментов плаценты, полученной после оперативных родов путем кесарева сечения. Ткани плаценты подвергали механической обработке и переносили в раствор 0,14% коллагеназы I на 30 минут с последующей фильтрацией клеток через 100 мкм нейлоновый фильтр. Полученные диссоциированные клетки высаживали в культуральные флаконы в полную среду IMDM с 10% ЭТС и культивировали при 37 °C в CO₂-инкубаторе до достижения 80–90% конфлюэнтного слоя, снимали с поверхности флакона 0,25%-ным раствором трипсин-ЭДТА, получая первичную культуру. Клетки первичной культуры рассаживали по новым флаконам в концентрации 1×10^6 в полную среду с последующим пассированием через 7–8 суток. Таким образом проводили 8 пассажей.

Для проведения замораживания МСК каждого пассажа (пассажи 2–7) в количестве 1×10^6 были ресуспендированы в 1 мл 5%-ного сывороточного альбумина с 10%-ным диметилсульфоксидом. Замораживание проводили в программируемом замораживателе IceCube 1810 (Sy-Lab, США) при постепенном снижении температуры с учетом прохождения критических точек замерзания внеклеточной и внутриклеточной воды. Протокол замораживания клеток:

1. Температура в камере замораживателя 4 °C при загрузке виал с клетками.
2. Снижение температуры со скоростью –2 °C/мин до –10 °C.
3. Снижение температуры со скоростью –25 °C/мин до –50 °C.
4. Повышение температуры со скоростью 15 °C/мин до –20 °C.
5. Снижение температуры со скоростью –1 °C/мин до –90 °C.

После выполнения программы замораживания криовиалы с МСК хранили при сверхнизкой температуре –196 °C в специализированном хранилище (Sy-Lab, США) в течение 4 месяцев.

Размораживали МСК в водяной бане при температуре 37 °C. Подсчет клеток и оценку жизнеспособности (ЖСП) осуществляли непосредственно после процедуры размораживания. Для исследования пролиферативного потенциала размороженные МСК переносили в полную среду IMDM с 10% ЭТС-МСК (Gibco, США), рассаживали во флаконы и культивировали при тех же условиях, что и клетки до замораживания.

Пролиферативную активность как свежих, так и размороженных МСК оценивали, определяя популяционное удвоение (ПУ) клеток каждого пассажа. Проводили подсчет МСК на выходе и рассчитывали ПУ, зная исходное количество клеток для данного пассажа, с применением формулы: $ПУ = \log(\text{кол-во клеток на выходе} / \text{исходное кол-во клеток}) / \log 2$.

Для статистического анализа результатов использовали программу STATISTICA 6.0. Применяли непараметрические методы статистики: достоверность различий между независимыми выборками оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни, проверку различий между двумя выборками парных измерений осуществляли с помощью T-критерия Вилкоксона.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами проанализирована ЖСП клеток в 54 пробах МСК плаценты, которые были заморожены после выполнения различного числа пассажей (2–7 пассажей), проведено сравнение жизнеспособности МСК до замораживания и после размораживания (см. таблицу).

Мы не наблюдали изменения ЖСП нативных МСК в зависимости от срока культивирования, она составляла 90–98% на разных пассажах, в среднем $93 \pm 1\%$.

Применение нашего протокола замораживания с использованием 5%-ного альбумина и 10%-ного ДМСО в качестве криопротектора позволило сохранить в среднем $81 \pm 9,5\%$ жизнеспособных МСК. После процедуры замораживания/оттаивания снижение жизнеспособности МСК на 7–21% по сравнению с исходным показателем наблюдалось независимо от того, на каком пассаже клетки были заморожены ($p < 0,05$). Восстановление клеток, рассчитанное на каждом пассаже как отношение жизнеспособных клеток после оттаивания к числу жизнеспособных клеток до замораживания, также оставалось высоким (78,4–92%). Сохранение уровня ЖСП более 80% после размораживания МСК из пуповинно-плацентарного комплекса, костного мозга и жировой ткани подтверждают и другие авторы [3–5]. В некоторых работах при проведении программируемого замораживания МСК в 5%-ном альбумине с 10%-ным ДМСО ЖСП клеток сохранялась выше 90% и пролиферативная активность клеток после оттаивания оставалась на уровне нативных МСК [6].

Анализ полученных нами результатов показал отсутствие достоверных различий между ЖСП размороженных клеток разных пассажей, то есть продолжительность культивирования МСК плаценты от 20 дней (1-й пассаж) до 60 дней (7-й пассаж) и количество манипуляций с клетками не влияли на их способность проходить критические точки замораживания/оттаивания и сохранения жизнеспособности (рис. 1). Другими авторами также не установлено различий в ЖСП клеток до и после замораживания, но отмечено снижение ЖСП с течением времени и увеличением популяционных удвоений [7].

Так как номер пассажа означает только количество пересевов клеток в культуре, не учитывая плотность клеток и их ЖСП, а, как известно, чем выше плотность посева, тем меньше удвоений популяции клеток проходит за пассаж, то для оценки динамики пролиферативной активности МСК от пассажа к пассажи и прироста клеток мы использовали показатели ПУ за пассаж и кумулятивного удвоения популяции.

Сравнение динамики клеточной пролиферации размороженных МСК из различных анатомических слоев плаценты продемонстрировало тенденцию к снижению

Жизнеспособность МСК плаценты разных пассажей до и после замораживания
The viability of MSCs from different passages before and after cryopreservation

ЖСП (%) \ Пассажи	2 (n=7)	3 (n=15)	4 (n=13)	5 (n=11)	6 (n=5)	7 (n=3)
До замораживания, Мед. (мин. – макс.)	90 (80–100)	94 (78–100)	97 (89–100)	98 (96–100)	97 (85–99)	90 (78–99)
После размораживания, Мед. (мин. – макс.)	80 (70–98)	80 (61–90)	90 (64–98)	77 (63–95)	79 (74–90)	76 (70–82)
Достоверность различий (P)	0,0673	0,0049	0,0029	0,005	0,0431	0,03

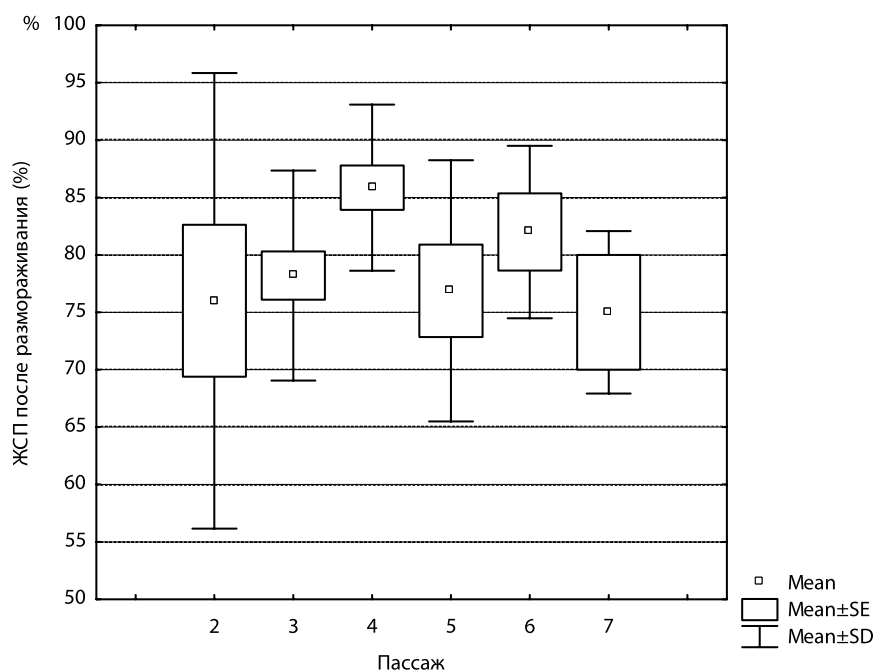


Рис. 1. Влияние продолжительности экспансии клеток на жизнеспособность МСК после криохранения

Fig. 1. Influence long-term cultivation on viability of MSCs placenta after cryostorage

ПУ во всех пробах МСК из децидуальной оболочки, амниона и хориона к 6-му, 7-му пассажам (рис. 2А). ПУ размороженных МСК децидуальной оболочки не отличалось на 2–5-м пассажах и составляло $2,78 \pm 0,71$, $2,85 \pm 0,19$, $2,48 \pm 0,15$ и $2,22 \pm 0,14$ соответственно, при этом ПУ МСК 2-го и 3-го пассажей было достоверно выше, чем ПУ 6-го и 7-го пассажей ($1,66 \pm 0,23$ и $1,73 \pm 0,12$) ($p < 0,05$). Такая же зависимость наблюдалась при экспансии размороженных МСК из амниона, пролиферативная активность которых была сопоставима на 2–4-м пассажах культивирования, а ПУ составляло $2,74 \pm 1,05$, $2,50 \pm 0,31$ и $1,91 \pm 0,45$ соответственно, тогда как ПУ на 6-м и 7-м пассажах снижалось до $1,48 \pm 0,15$ и $1,41 \pm 0,55$ ($p < 0,05$). ПУ размороженных МСК хориона сохраняло тенденцию к снижению с увеличением срока экспансии клеток, и на 2-м и 3-м пассажах оно было выше ($2,7 \pm 0,94$ и $2,69 \pm 0,33$), чем на 6-м и 7-м пассажах – $1,46 \pm 0,16$ и $1,31 \pm 0,49$ соответственно ($p < 0,05$). Снижение ПУ размороженных МСК с увеличением непрерывного пассирования перед заморозкой подтверждают и другие исследования [7].

Для исследования влияния процессов замораживания, оттаивания и хранения при сверхнизкой температуре -196°C на пролиферативную активность МСК было проведено сравнение кумулятивного удвоения популяций интактных и размороженных МСК. Коэффициент ПУ был рассчитан для культур со 2-го по 7-й пассажи, так как МСК 1-го пассажа не подвергали замораживанию в связи с малочисленностью

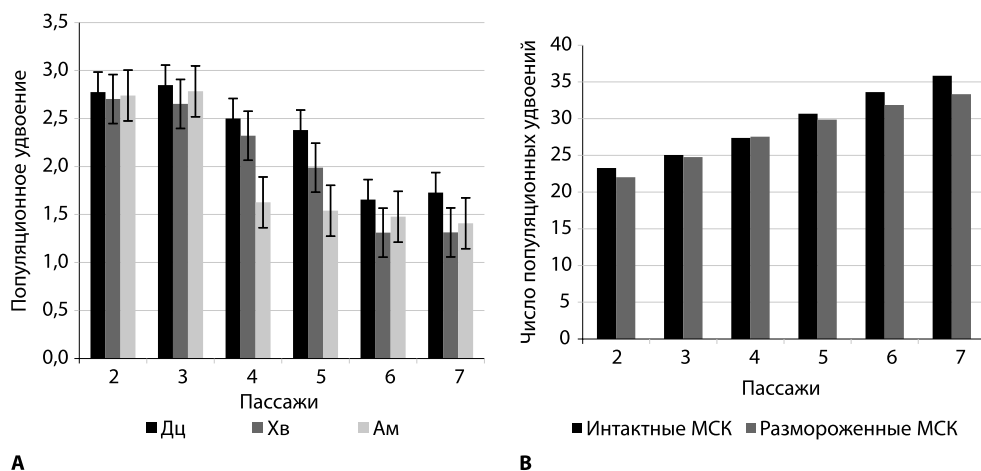


Рис. 2. Популяционное удвоение МСК плаценты: А – популяционное удвоение размороженных МСК из различных анатомических слоев плаценты (Дц – децидуальная оболочка, Хв – ворсины хориона, Ам – амниотическая мембрана) разных пассажей; В – кумулятивное популяционное удвоение МСК плаценты различных пассажей до и после замораживания
Fig. 2. Population doubling of the MSCs placenta: А – population doubling thawed MSCs at different passages (Dc – decidua, Ch – chorion, Am – amnion); В – cumulative population doubling MSCs of placenta before and after freezing

клеток. Полученные данные свидетельствовали об отсутствии достоверной разницы кумулятивного ПУ на каждом пассаже культивирования между МСК до и после замораживания. Так, кумулятивное ПУ нативных МСК после 2-го пассажа составляло в среднем $22,8 \pm 2,5$ и к 7-му увеличивалось до $38,3 \pm 3,2$, а кумулятивное ПУ размороженных МСК с $22,02 \pm 0,4$ после 2-го пассажа повышалось до $33,4 \pm 2,4$ после 7-го. От 35 до 40 кумулятивных популяционных удвоений на протяжении 6 пассажей МСК наблюдали и в других исследованиях [7].

Таким образом, результаты нашего исследования показали, что МСК плаценты сохраняют высокую жизнеспособность и пролиферативную активность после воздействия сверхнизких температур и прохождения клетками критических точек процедур замораживания и размораживания, что подтверждается отсутствием достоверной разницы в приросте клеток на каждом пассаже между МСК до замораживания и МСК после криохранения. Ранее подобные выводы были сделаны при изучении влияния замораживания на свойства МСК, выделенных из костного мозга и жировой ткани. Пролиферативная способность МСК, выделенных из этих источников, минимально подвержена влиянию замораживания и оттаивания: жизнеспособность клеток сохранялась на уровне выше 90%, а пролиферативная активность клеток после размораживания сохранялась на уровне нативных МСК [6]. Также жизнеспособность и пролиферативная активность МСК не зависели от длительности воздействия сверхнизких температур при криохранении [8]. Время удвоения популяции МСК из амниотической жидкости также не отличается в МСК до и после замораживания [9].



С другой стороны, есть результаты экспериментов, которые показывают увеличение скорости пролиферации после замораживания МСК костного мозга и криохранения [4].

В ряде исследований продемонстрировано, что МСК после замораживания/оттаивания сохраняли не только пролиферативный потенциал, но и пластичность, а также свои иммуномодуляторные свойства [6, 10]. Отмечалось, что при использовании программируемого замораживания МСК в растворе 5%-ного альбумина с 10%-ным ДМСО клетки после размораживания не проявляли туморогенные свойства [6].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Депонированные при сверхнизкой температуре культуры МСК послеродовой плаценты сохраняют жизнеспособность и обладают высоким пролиферативным потенциалом, сопоставимым с нативными МСК, что позволяет начать применение аллогенных МСК по первому требованию, минуя этап длительного изготовления персонифицированного продукта МСК.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Vaes B., Van't H.W., Deans R. Application of Multistem allogeneic cells for immunomodulatory therapy: clinical progress and pre-clinical challenges in prophylaxis for graft versus host disease. *Front Immunol.* 2012;3:1–9.
2. Harris D.T. Banking of Adipose- and Cord Tissue-Derived Stem Cells: Technical and Regulatory Issues. *Adv Exp Med Biol.* 2016;951:147–154. doi: 10.1007/978-3-319-45457-3_12
3. 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. *Current Stem Cell Research & Therapy.* 2013;8(1):60–72.
4. Ginis I., Grinblat B., Shirvan M.H. Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18:453–463.
5. Yong K.W., Pingguan-Murphy B., Xu F. Phenotypic and functional characterization of long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Sci Rep.* 2015;5:9596.
6. Luetzkendorf J., Nerger K., Hering J. Cryopreservation does not alter main characteristics of good manufacturing process-grade human multipotent mesenchymal stromal cells including immunomodulating potential and lack of malignant transformation. *Cytotherapy.* 2015;17:186–198.
7. Pollock K., Sumstad D., Kadidlo D. Clinical mesenchymal stem cell products experience functional changes in response to freezing. *Cytotherapy.* 2015;17:38–45.
8. Martinello T., Bronzini I., Maccatrozzo L. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci.* 2011;91:18–24.
9. Seo J.M., Sohn M.Y., Suh J.S. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology.* 2011;62:167–173.
10. Minonzio G., Corazza M., Mariotta L. Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. *Cryobiology.* 2014;69:211–216.