

Вплив факторів росту на кріоконсервовані мезенхімальні стромальні клітини

Н.О. Волкова, М.С. Юхта, А.М. Гольцев

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків;
e-mail: volkovana781@gmail.com

У роботі було досліджено вплив факторів росту та диференціювання на кріоконсервовані мезенхімальні стромальні клітини, отримані з кісткового мозку, жиркової та хрящової тканини. Додавання до культурального середовища фактора росту фібробластів (20 нг/мл) призводило до підвищення у 2,6 та 2,1 рази проліферативного потенціалу кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин (КрМСК) з кісткового мозку та жиркової тканини. Застосування трансформуючого ростового фактора β (10 нг/мл) збільшувало синтез колагену II типу у 7,2 та 6,1 рази і глікозаміногліканів у 5,1 та 2,6 рази відповідно для КрМСК з кісткового мозку та жиркової тканини. Проліферативна активність, синтез колагену II типу та глікозаміногліканів КрМСК з хрящової тканини не зазнавали змін під впливом досліджених факторів, проте характеризувалися порівняно більшою активністю синтетичних процесів відносно КрМСК з кісткового мозку та жиркової тканини. Отримані результати можуть бути використані для обґрунтування та розробки методики застосування кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин у клінічній практиці для лікування уражень тканин опорно-рухового апарату.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини; фактори росту; проліферація; колаген; глікозаміноглікани.

ВСТУП

Ушкоджена хрящова тканина відрізняється від інших тканин незначною швидкістю регенерації, тому при травмуванні, перевантаженнях або вікових змінах, дефектні ділянки зазвичай не відновлюють початкову структуру та функцію, що призводить до хронічних дегенеративних ушкоджень, таких як остеоартрит [1]. Регенеративна здатність суглобового хряща обмежена ймовірно через її гіпоклітинність, гіповаскулярність, низьку метаболічну активність хондроцитів та мезенхімальних прогенеторів (резиденти з'єднувальної тканини). Тому єдиним способом скоротити термін тимчасової втрати працездатності, знизити рівень інвалідності та підвищити рівень життя хворих після травм є сприяння прискоренню відновлення хрящової тканини за допомогою сучасних

методів регенеративної медицини. Використання клітин, розмножених *in vitro*, зокрема мезенхімальних стромальних клітин (МСК), а також факторів росту, що продукуються цими клітинами, вже показало свою ефективність у доклінічних та деяких клінічних дослідженнях [2, 3].

Виділення клітин мезенхімального походження з органів і тканин, їх культивування та диференціювання є першим етапом використання матеріалу в регенеративній медицині [4, 5]. Отриманий таким чином запас стовбурових та спеціалізованих клітин може зберігатися при низьких температурах без суттєвих змін морфофункціональних характеристик, що дозволяє їх вільно транспортувати та розморожувати безпосередньо перед терапевтичним застосуванням.

Хоча джерел отримання МСК на сьогоднішній день відомо досить багато [3], для

регенерації суглобового хряща найбільш перспективними є клітини, отримані з кісткового мозку, жирової або хрящової тканини [6 - 8]. За даними авторів [9, 10] МСК та біологічно активні речовини, які вони продукують, можуть сприяти регенерації не лише за допомогою прямої диференціації клітин, але і секрецією факторів росту. Останні є одними з найбільш важливих молекулярних родин, що беруть участь в регенерації. За допомогою білкових рецепторів фактори росту зв'язуються з клітинами-мішенями. Рецепторні зв'язки зумовлюють внутрішньоклітинні реакції, які, однак, до кінця не з'ясовані. Слід зазначити, що регуляторами прохондрогенних клітин та безпосередньо хондрогенного диференціювання є низка внутрішньоклітинних сигнальних молекул і факторів росту, до яких відносяться основний фактор росту фібробластів (bFGF), трансформуючий фактор росту β (TGF- β), кістковий морфогенетичний білок (BMP), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), інсуліноподібний фактор росту (IGF), епідермальний фактор росту (EGF), ретиноева кислота, а також глікопротеїни [11, 12].

Нині більшість досліджень з використанням МСК з різних джерел для отримання хондроцитів мають серйозний недолік: клітини при культивуванні та диференціюванні мають різну стадію розвитку, але вони не сягають гіпертрофічної стадії, яка відповідає хондроцитам з суглобового хряща. Це пояснюється тим, що синтез компонентів матриці хряща (колаген II типу і агрекан) може відбуватися лише за наявності TGF β , який діє як індуктор повного хондрогенезу МСК. В інших дослідженнях, спрямованих на тестування хондрогенного потенціалу МСК, автори пропонують комбінувати трансформуючий фактор росту β та кістковий морфогенетичний білок [13].

Раніше нами було показано, що клітинні культури отримані з кісткового мозку та альтернативних джерел, – сухожильної та жирової тканин, – мають імунофенотип клітин

попередників мезенхімального походження [14], зберігають здатність до проліферації, міграції та синтезу колагену I типу [15].

Мета нашої роботи - вивчення впливу факторів росту та диференціювання (TGF β та bFGF) на кріоконсервовані МСК (КрМСК) щурів залежно від джерела їх отримання (кістковий мозок, жирова та хрящова тканини).

МЕТОДИКА

МСК кісткового мозку отримували з резекційованих фрагментів стегнової кістки розміром 3-4 мм нелінійних щурів (n=7, масою 150 \pm 25 г). Клітини виділяли вимиванням за допомогою розчину Хенкса («РАА», Австрія) з пропусканням крізь голки з діаметром, що зменшувався. Наступний етап включав центрифугування при 840 g протягом 5 хв. Отриману суспензію клітин висіювали на культуральні флакони площею 25 см² («РАА», Австрія). Посівна концентрація клітин становила 1·10³/см² флакона.

Первинні суспензії клітин жирової і хрящової тканин отримували за допомогою їх ферментативної дезагрегації. Для цього використовували біоптати сальника (75 \pm 3 мг) та суглобового хряща (25 \pm 3 мг) щурів-самців (n=7, масою 150 \pm 25 г), які промивали розчином Хенкса з гентаміцином (150 мкг/мл; «Фармак», Україна) та інкубували у розчині колагенази II типу 1,5 мг/мл («ПанЕко», Росія) при 37°C протягом 18 год. Клітини виділяли з біоптатів ресуспендуванням з наступним центрифугуванням при 840g протягом 3 хв. До осаду додавали середовище культивування та висівали на культуральний пластик. Щільність посіву клітин становила 1·10⁴/см² культурального флакона.

Живильне середовище культивування в усіх випадках містило: середовище IMDM («РАА», Австрія), 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби («HyClone», США), канаміцин («Фармак», Україна) - 150 мкг/мл та амфотеріцин Б («РАА», Австрія) - 5 мкг/мл. Середовище культивування змінювали кожні

3 доби. У роботі були використані стандартні умови культивування при 37°C в атмосфері 5% CO₂ з використанням інкубатора («Sanyo», Японія). По досягненні моношару культури клітин пасивували (0,25%-й розчин трипсину та розчин Версену у співвідношенні 1:1).

Кріоконсервування культур МСК здійснювали під захистом 10% ДМСО («ПанЭко», Росія) з додаванням 20% ембріональної сироватки. Розчин кріопротектора готували на живильному середовищі. Отримані суспензії вміщували по 1 мл у кріопробірки Nunc. Швидкість охолодження складала 1°C/хв до -80°C з подальшим зануренням у рідкий азот [16]. Відігрів здійснювали на водяній бані при 40°C до появи рідкої фази. Видалення кріопротектора проводили додаванням 1:9 розчину Хенкса з наступним центрифугуванням при 840 g протягом 5 хв. При культивуванні досліджуваних культур після кріоконсервування застосовували такі самі умови, як і для початкових культур. Цілісність мембрани клітин оцінювали за тестом на виключення суправітального барвника трипанового синього («Sigma-Aldrich», США).

Для визначення впливу TGFβ (5 та 10 нг/мл, «Sigma-Aldrich», США) та bFGF (10 та 20 нг/мл, «Sigma-Aldrich», США) на морфологічні та проліферативні характеристики КрМСК з кісткового мозку, жирової та хрящової тканин проводили культивування протягом 12 діб. Живильне середовище складалося з IMDM, 10% ембріональної сироватки, TGFβ або bFGF в зазначених концентраціях. Контролем були культури КрМСК, культивовані без використання фактора.

Визначення глікозаміногліканів в екстрацелюлярному матриці досліджених культур КрМСК оцінювали за допомогою забарвлення Toluidine blue («Fluka», Німеччина). Кількість клітин з інтенсивним забарвленням на глікозаміноглікани підраховували у світловому мікроскопі та визначали їх відсоток до загальної кількості клітин.

Забарвлення культур КрМСК на колаген II типу проводили з використанням монокло-

нальних антитіл до колагену II типу (1:200, «Sigma-Aldrich», США) та CFTM488A («Sigma-Aldrich», США), згідно з інструкцією фірми виробника. Флуоресцентну мікроскопію препаратів проводили за допомогою конфокального скануючого мікроскопа («Carl Zeiss LSM 510 Meta», Німеччина). Препарати додатково фарбували люмінесцентним барвником DAPI (1 мкг/мл, «Sigma-Aldrich», США) для візуалізації ядер клітин. Підраховували кількість клітин позитивно забарвлених на колаген II типу та визначали їх відсоток до загальної кількості клітин.

Проліферативну активність у досліджених культурах КрМСК з додаванням факторів росту та без визначали на термінах культивування 1, 3, 7, 12 діб за допомогою МТТ-тесту [17]. Оптичну щільність розчину формазану в супернатанті вимірювали на ФЕК («КФК-2-УХЛ42», Росія) при довжині хвилі 540 нм. Як контроль використовували культуральне середовище без клітин.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми «Microsoft Office Excel 2007» та «Statistika 8». При нормальному розподілі змінних достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента. Відмінності вважали статистично значущими при P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Першим етапом роботи було дослідження цілісності мембран клітин після кріоконсервування з використанням тесту на виключення трипанового синього. МСК кісткового мозку після кріоконсервування-відігріву мали 79,2±5,8% клітин з неушкодженою мембраною, що у 1,22 раза нижче від відповідного показника у початкових культурах (96,3±3,7%). Показник життєздатності у випадку кріоконсервованих МСК жирової тканини був знижений у 1,28 раза відносно нативних культур (95,8±6,2%) та становив 74,6±4,4%. Зниження відсотка життєздатних клітин спостерігалось також в МСК хрящової

тканини після кріоконсервування ($78,4 \pm 3,2$), а саме в 1,24 раза стосовно нативного аналога ($97,5 \pm 2,9$).

Наступним етапом роботи було проведення досліджень впливу bFGF (10 та 20 нг/мл) та TGF β (5 та 10 нг/мл) на проліферативну активність КрМСК з досліджених джерел (рис. 1 - 3). Результати визначення приросту КрМСК кісткового мозку при застосуванні факторів росту bFGF та TGF β наведені на рис. 1. Динаміка росту клітин була схожою, але приріст клітин був вірогідно більшим при застосуванні bFGF. Так на строках культивування КрМСК кісткового мозку (3, 7 та 12 діб) з додаванням bFGF (20 нг/мл) досліджений показник був значуще вищим порівняно з контролем (в 3,2; 2,1 та 2,6 раза відповідно). На 12-ту добу культивування КрМСК кісткового мозку з використанням bFGF (10 нг/мл) проліферативна активність збільшувалась в 1,7 раза стосовно контролю. При застосуванні TGF β (5 та 10 нг/мл) на всіх досліджених строках вірогідних змін дослідженого показника не відбувалося. Проліферативна активність КрМСК жирової тканини при застосуванні факторів росту bFGF та TGF β наведена на рис. 2. На 7- та 12-ту добу культивування КрМСК жирової

тканини з використанням bFGF (10 нг/мл) приріст клітин був вищим в 1,6 та 1,7 раза, а в концентрації 20 нг/мл – у 2,0 та 2,1 раза відповідно порівняно з контролем. Таким чином, додавання фактора росту bFGF до культурального середовища призводило до підвищення проліферативної активності КрМСК жирової тканини та мало дозозалежний ефект як і у разі КрМСК кісткового мозку. Застосування TGF β (5 та 10 нг/мл) не спричинювало значимі зміни в дослідженому показнику КрМСК жирової тканини. У разі КрМСК хрящової тканини застосовані фактори росту та диференціювання не впливали на динаміку приросту (рис. 3).

КрМСК кісткового мозку характеризувалися наявністю веретено- та парусоподібних клітин, $12,6 \pm 2,4\%$ з яких були позитивно забарвлені на колаген II типу (див. рис. 4, а). При застосуванні bFGF (10 та 20 нг/мл) відносна кількість клітин, позитивно забарвлених на колаген II типу, достовірно збільшувалась в 3,6 та 4,9 раза відповідно. Використання TGF β (5 та 10 нг/мл) призводило до збільшення дослідженого показника в 6,5 та 7,2 раза відповідно стосовно контролю. Відносна кількість клітин КрМСК кісткового мозку, позитивно забарвлених на глікозаміноглікани,

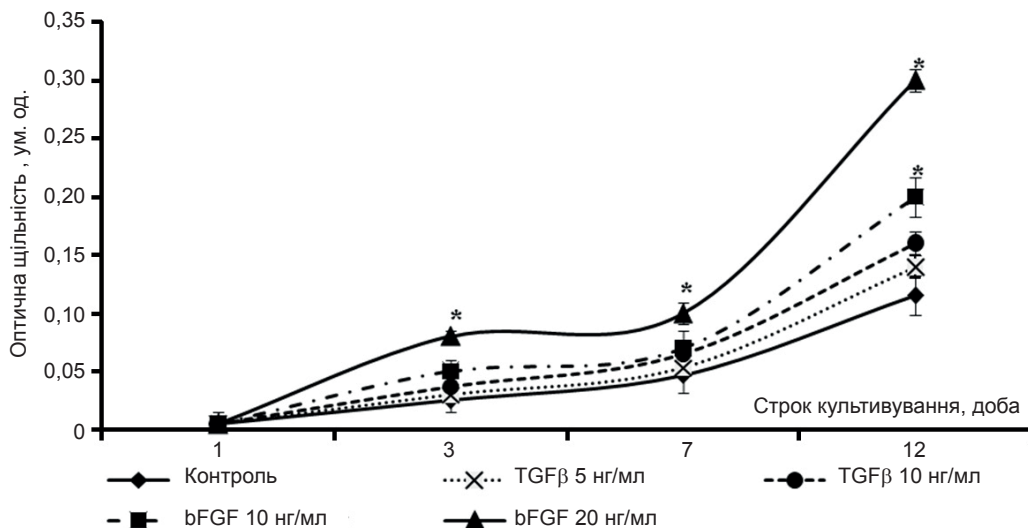


Рис. 1. Проліферативна активність кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин з кісткового мозку з додаванням факторів bFGF (10 та 20 нг/мл) та TGF β (5 та 10 нг/мл). * $P < 0,05$ щодо контролю

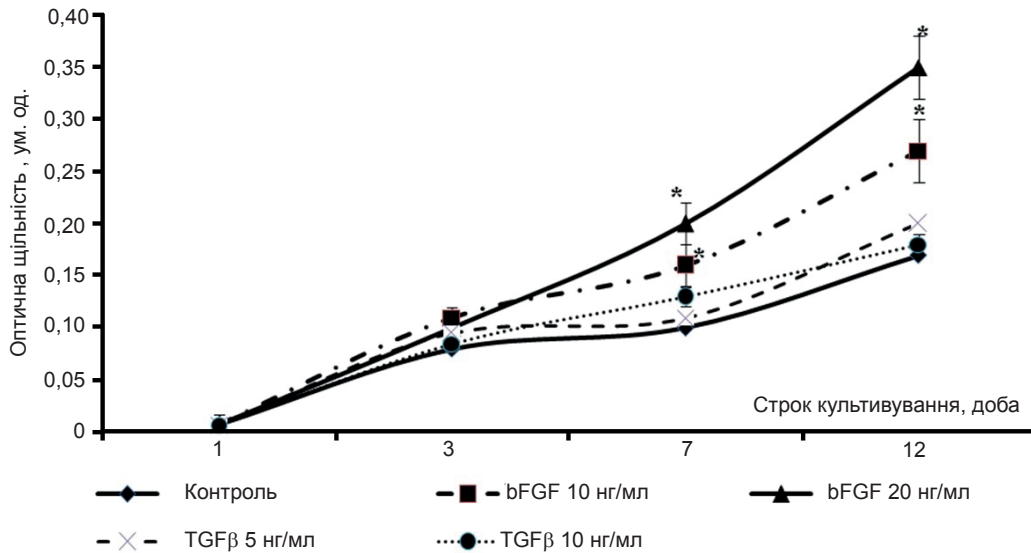


Рис. 2. Проліферативна активність кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини з додаванням bFGF (10 та 20 нг/мл) та TGFβ (5 та 10 нг/мл). * P<0,05 щодо контролю

у контрольній групі становила $12,1 \pm 3,8\%$. Використання bFGF (20 нг/мл) збільшувало досліджений показник у 3,9 раза стосовно контрольних зразків. Застосування TGFβ (5 та 10 нг/мл) посилювало синтез глікозаміногліканів у 4,3 та 5,1 раза відповідно (рис. 4, б).

КрМСК жирової тканини при культивуванні були представлені парусо-, зірчато- та

веретеноподібними клітинними елементами, $10,4 \pm 3,7\%$ з яких були позитивно забарвлені на колаген II типу (див. рис. 4, а). У разі застосування bFGF (10 та 20 нг/мл) відносна кількість клітин, забарвлених на колаген II типу, збільшувалась у 3,1 та 3,6 раза. Вірогідної різниці між застосованими концентраціями дослідженого фактора не відзначали. Вплив

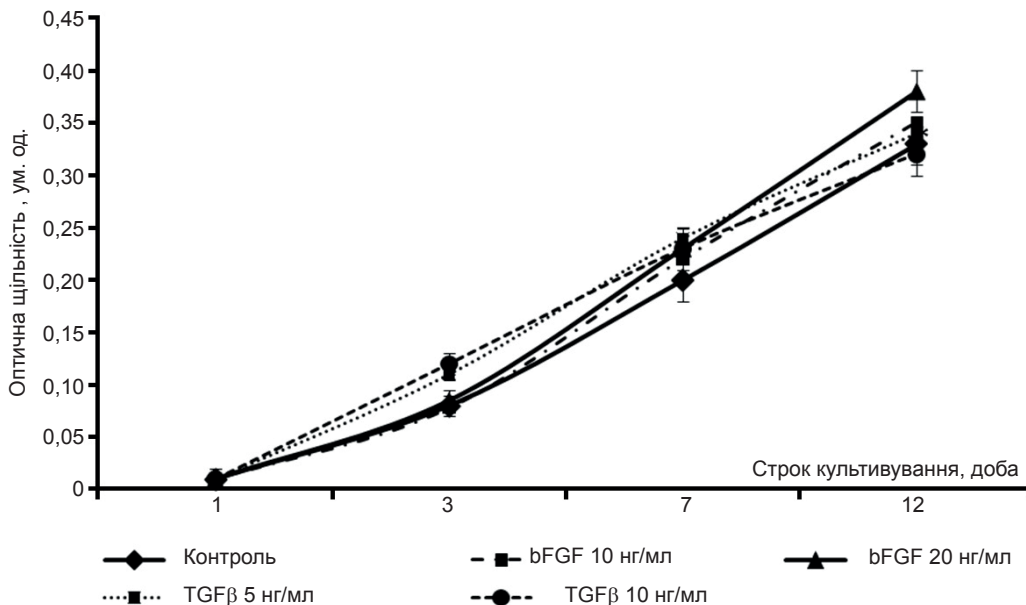


Рис. 3 Проліферативна активність кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин з хрящової тканини з додаванням bFGF (10 та 20 нг/мл) та TGFβ (5 та 10 нг/мл)

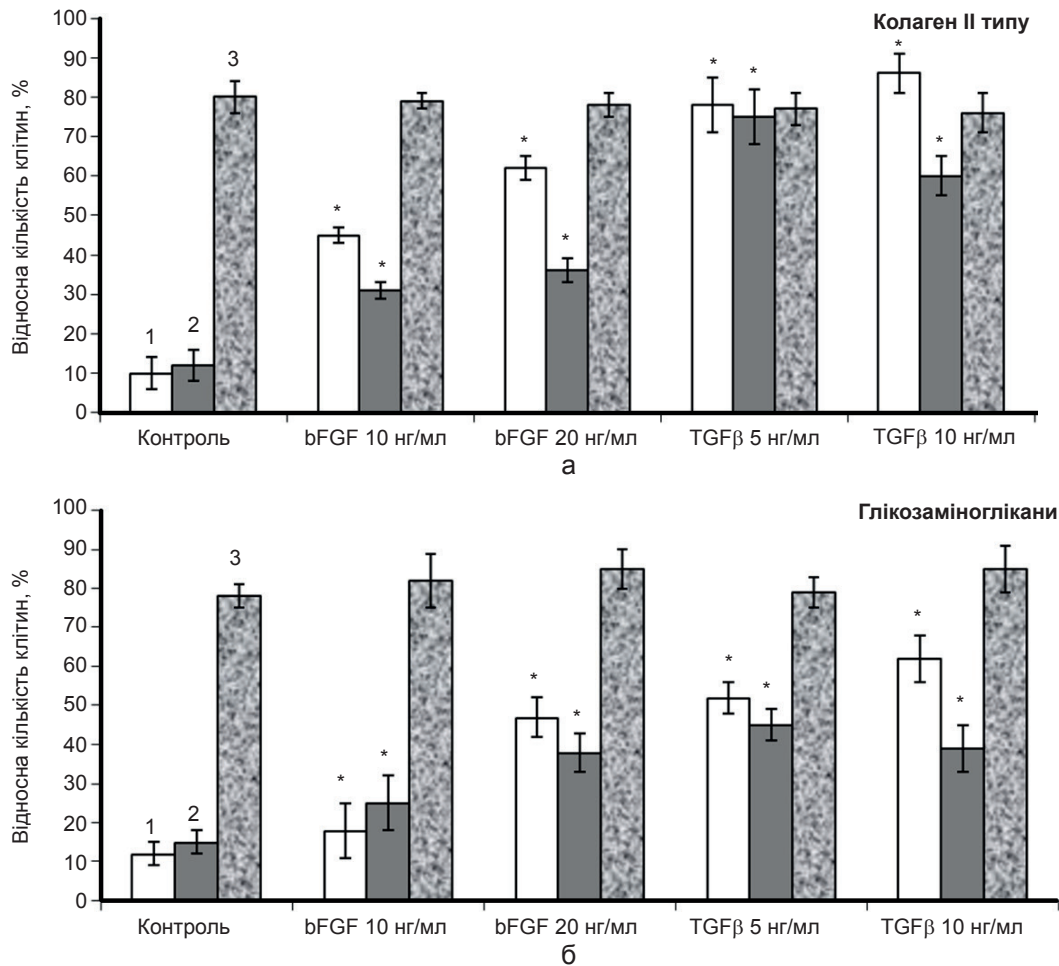


Рис. 4. Вплив bFGF (10 та 20 нг/мл) та TGFβ (5 та 10 нг/мл) на здатність до синтезу колагену II типу (а) та глікозаміногліканів (б) кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин з кісткового мозку (1), жирової (2) та хрящової (3) тканин на 12-ту добу культивування. * P<0,05 щодо контролю

фактора TGFβ на здатність до синтезу колагену II типу КрМСК жирової тканини не мав дозозалежного характеру. Його додавання до культурального середовища в концентрації 5 та 10 нг/мл збільшувало відносну кількість клітин, позитивно забарвлених на колаген II типу, в 7,5 та 6,1 раза відповідно (див. рис. 4, а). Відносна кількість КрМСК жирової тканини, позитивно забарвлених на глікозаміноглікани, у контролі становила $15,2 \pm 2,1\%$ (див. рис. 4, б). Використання bFGF (10 та 20 нг/мл) збільшувало досліджений показник у 1,7 та 2,5 раза стосовно контролю. Застосування TGFβ (5 та 10 нг/мл) призводило до

збільшення синтезу глікозаміногліканів у 3,0 та 2,6 раза відповідно щодо контролю (див. рис. 4, б).

КрМСК хрящової тканини при культивуванні були представлені полігональними та веретеноподібними клітинними елементами, $80,1 \pm 5,2\%$ з яких були позитивно забарвлені на колаген II типу та $78,5 \pm 3,7\%$ на глікозаміноглікани. Використання bFGF та TGFβ в досліджених концентраціях не призводило до вірогідних змін у синтезі колагену II типу та глікозаміногліканів відносно контрольних зразків та між застосованими концентраціями (див. рис. 4 а, б).

Таким чином, досліджені фактори росту та диференціювання bFGF та TGF β не мали істотного впливу на морфофункціональний стан КрМСК хрящової тканини протягом 12 діб культивування. Проте, якщо порівняти досліджені показники, можна відмітити, що КрМСК хрящової тканини характеризувалися більш високою проліферативною та синтетичною активністю, ніж КрМСК кісткового мозку та жирової тканини.

ОБГОВОРЕННЯ

Одним з ключових моментів клітинної терапії є отримання матеріалу у достатній кількості з визначеними морфофункціональними характеристиками залежно від конкретної клінічної ситуації. Необхідний час для проліферації та спрямованого диференціювання клітин, інколи є лімітуючим фактором. Пришвидшити ці процеси *in vitro* можливо додаванням до середовища культивування факторів росту та диференціювання – біологічно активних речовин, що здатні регулювати функції клітин, ініціюючи внутрішньоклітинні каскади трансдукції сигналів при зв'язуванні з білковими рецепторами на їх поверхні.

Вибір факторів росту у цій роботі оснований на відомостях щодо їх впливу на хондрогенез стовбурових клітин. Раніше було виявлено, що TGF β є ключовим фактором хондрогенного диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин, який стимулює початкові стадії клітинної конденсації та синтез компонентів позаклітинного матриксу, підвищенням експресії N-кадгеринів та асоціації комплексу Smad 3/4 і Sox9 з енхансером гена колагена II типу [18, 19].

Ініціація і підтримка хондрогенезу мезенхімальними стовбуровими клітинами під впливом TGF β пов'язані з його впливом на MAP-киназу і модуляцією передачі сигналів Wnt. Більше того, в процесі ембріонального розвитку нижньої щелепи TGF- β є регулятором детермінації хондрогенних клітин за допомогою контролю експресії Sox9 [19].

Фактор росту фібробластів є потужним стимулятором ангиогенезу та регулятором клітинної міграції і проліферації [20], механізм дії якого на клітини полягає в зв'язуванні з тирозинкіназою рецептора bFGF (FGFR), що призводить до активізації ГТФ-ази сімейства Ras і Rho та запуску сигнальних шляхів мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК). Також FGFR може активувати фосфоліпазу C γ /протеїнкіназу C, що призводить до включення сигнального шляху PI3K/Akt і індукує регуляцію транскрипційного фактора c-Jun [21].

У нашій роботі застосування bFGF призводило до вираженого збільшення проліферативної активності КрМСК кісткового мозку та жирової тканини, порівняно з використанням TGF β . Відносна кількість клітин, позитивно забарвлених на колаген II типу, вірогідно збільшувалась в КрМСК кісткового мозку та жирової тканини, при застосуванні TGF β . Аналіз результатів впливу bFGF та TGF β на синтез глікозаміногліканів в досліджених культурах свідчив, що досліджений показник збільшувався в КрМСК кісткового мозку під впливом TGF β (10 нг/мл), а у разі КрМСК жирової тканини – TGF β (5 нг/мл). Підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що застосування TGF β має морфогенетичний вплив на КрМСК з кісткового мозку та жиру, що проявляється у підвищенні функціональної активності в клітинах досліджених культур. Водночас bFGF виявляє більш високу здатність до стимуляції проліферації культур МСК із кісткового мозку та жиру. Застосування TGF β та bFGF не призводило до змін в проліферативній та синтетичній активності кріоконсервованих культур МСК з хрящової тканини, що ймовірно пов'язано як з відносно високими вихідними характеристиками культури клітин, так і можливо недостатньою концентрацією застосованих факторів, що потребує подальшого дослідження.

Отримані результати слід розглядати як одну зі спроб визначення оптимального

потенційного джерела для застосування КрМСК у поєднанні з факторами росту та диференціювання в регенеративній медицині ушкоджень тканин опорно-рухового апарату. Нині здебільшого механізми, за допомогою яких трансплантовані клітини стимулюють регенеративно-репаративні процеси в ушкоджених тканинах залишаються недостатньо вивченими. Представлені в роботі експериментальні результати роблять певний внесок в їх розуміння та можуть бути корисні у розробці терапевтичних стратегій. Таким чином, поряд із кістковим мозком та жировою тканиною, які є найбільш поширеним джерелом стовбурових клітин, альтернативним джерелом МСК може бути хрящова тканина. Визначена різна чутливість МСК з неоднакових джерел до впливу bFGF та TGF β дає змогу їх комбінувати *in vitro* при підготовці клітинного матеріалу залежно від конкретної клінічної потреби. Результати проведеного дослідження можуть бути використані для створення кріобанку перспективних ліній клітин стромального походження з можливістю їх наступного застосування для потреб біотехнології та клітинної терапії.

ВИСНОВКИ

1. Кріоконсервовані культури клітин стромального походження, отримані з кісткового мозку, жирової та хрящової тканин, зберігають здатність до проліферації, синтезу глікозаміногліканів та колагену II типу.

2. Додавання до культурального середовища фактора росту фібробластів призводить до збільшення проліферативної активності кріоконсервованих культур МСК з кісткового мозку та жирової тканини та має дозозалежний ефект.

3. Застосування трансформуючого фактора росту β та фактора росту фібробластів не призводить до змін у проліферативній та синтетичній активності кріоконсервованих культур МСК з хрящової тканини.

4. Використання трансформуючого фак-

тора росту β сприяє збільшенню відносної кількості клітин, що синтезують колаген II типу та глікозаміноглікани, в кріоконсервованих культурах МСК з кісткового мозку та жирової тканини.

Робота проведена за підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства», договір № 2.2.6.94/18.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Н.А. Волкова, М.С. Юхта, А.Н. Гольцев

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА НА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

В работе было исследовано влияние факторов роста и дифференцирования на кріоконсервированные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга, жировой и хрящевой тканей. Добавление к культуральной среде фактора роста фибробластов (20 нг / мл) приводило к повышению в 2,6 и 2,1 раза пролиферативного потенциала кріоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток (КрМСК) из костного мозга и жировой ткани. Применение трансформирующего ростового фактора β (10 нг/мл) увеличивало синтез коллагена II типа в 7,2 и 6,1 раза и гликозоаминогликанов в 5,1 и 2,6 раза соответственно для КрМСК из костного мозга и жировой ткани на 12-е сутки культивирования. Пролиферативная активность, синтез коллагена II типа и гликозаміногліканов КрМСК из хрящевой ткани не претерпевали изменения под влиянием исследованных факторов, однако характеризовались сравнительно большей активностью синтетических процессов относительно КрМСК из костного мозга и жировой ткани. Полученные результаты могут быть использованы для обоснования и разработки методики применения КрМСК в клинической практике с целью лечения поврежденной тканью опорно-двигательного аппарата.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; факторы роста; пролиферация; коллаген; гликозаміноглікани.

N.O. Volkova, M.S. Yukhta, A.M. Goltsev

INFLUENCE OF GROWTH FACTORS ON CRYOPRESERVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS

The study investigated the effect of growth and differentiation factors on cryopreserved mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose and cartilage tissues. It was shown that the addition of fibroblast growth factor (20 ng / ml) to the culture medium resulted in a 2.6 and 2.1 fold increasing in the proliferative potential of cryopreserved mesenchymal stromal cells (CrMSC) from bone marrow and adipose tissue. The use of transforming growth factor β in concentration 10 ng/ml increased the synthesis of type II collagen by 7.2 and 6.1 times and glycosaminoglycans in 5.1 and 2.6 times, respectively, for CrMSCs from bone marrow and adipose tissue on the 12th day of culturing. Proliferative activity, the synthesis of type II collagen and glycosaminoglycans of CrMSCs from cartilaginous tissue did not undergo changes under the influence of the investigated factors, but they were characterized by a relatively greater activity of synthetic processes compare to CrMSCs from bone marrow and adipose tissue. The obtained data can be used to substantiate and develop a technique for the application of CrMSCs in clinical practice to treat the damages of musculoskeletal system.

Key words: mesenchymal stromal cells; growth factors; proliferation; collagen; glycosaminoglycans.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv; e-mail: volkovana781@gmail.com

REFERENCES

- Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002; 10(6): 432-63. doi: 10.1053/joca.2002.0801.
- Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015; 71(2): 181-97. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.07.003.
- Volkova N, Yukhta M, Goltsev A. Cryopreserved mesenchymal stem cells stimulate regeneration in an intervertebral disc. *Biomedicines*. 2015; 3(3): 237-247. doi:10.3390/biomedicines3030237.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(4): 568-84.
- Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodriguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2005; 48(7): 1416-23. doi: 10.1007/s10350-005-0052-6.
- 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): 315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.
- Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev*. 2008; 17(4): 761-73. doi: 10.1089/scd.2007.0217.
- Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004; 14(4-6): 311-24. doi: 10.1159/000080341.
- Du M, Zhu T, Duan X, Ge S, Li N, Sun Q et al. Acellular dermal matrix loading with bFGF achieves similar acceleration of bone regeneration to BMP-2 via differential effects on recruitment, proliferation and sustained osteodifferentiation of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;70(Pt 1):62-70. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.049.
- Bocelli-Tyndall C, Zajac P, Di Maggio N, Trella E, Benvenuto F, Iezzi G et al. Fibroblast growth factor 2 and platelet-derived growth factor, but not platelet lysate, induce proliferation-dependent, functional class II major histocompatibility complex antigen in human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(12): 3815-25. doi: 10.1002/art.27736.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000; 8(5): 309-34. doi: 10.1053/joca.1999.0306.
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*. 2006; 97(1): 33-44. doi: 10.1002/jcb.20652.
- Bobick BE, Chen FH, Le AM, Tuan RS. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2009; 87(4): 351-71. doi: 10.1002/bdrc.20167.
- Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Morphological and functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose tissue and tendons. *Cell and Organ Transplantation*. 2016; 4 (2): 200-5. doi:10.22494/cot.v4i2.64.
- Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Comparative study of the effect of bFGF and plasma rich in growth factors on cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow and tendon of rats. *Cell and Organ Transplantation*. 2017; 5(2): 170-5. doi:10.22494/cot.v5i2.75.
- Volkova NA, Goltsev AN. Cryopreservation effect on proliferation and differentiation potential of cultured chorion cells. *CryoLetters*. 2015; 36(1): 25-9.
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
- Rodrigues M, Griffith LG, Wells A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2010; 1: 32.

19. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(12):1539-45. doi: 10.1016/j.joca.2009.06.008.
20. Kottakis F, Polytarchou Ch., Foltopoulou P, Sanidas I, Kampranis SC, Tsihchlis PN. FGF-2 regulates cell proliferation, migration and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. *Mol Cell*. 2011; 43(2): 285-98. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.020.
21. Choi SC, Kim SJ, Choi JH, Park C, Shim WJ, Lim DS. Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Stem Cells Dev*. 2008; 17: 725-36. doi: 10.1089/scd.2007.0230.

*Матеріал надійшов
до редакції 11.07.2018*