

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток человека с использованием олигосахаридов

Е.Ю. Рогульская, В.В. Муценко, Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Human Mesenchymal Stromal Cells Using Oligosaccharides

O.Yu. Rogulska, V.V. Mutsenko, Yu.A. Petrenko

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

Экспериментальное и клиническое применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) требует разработки новых подходов и усовершенствования существующих методов криоконсервирования клеток. Криозащитные среды для эффективного замораживания МСК обычно содержат 10% ДМСО и эмбриональную сыворотку, которые приходится удалять после отогрева, что может приводить к значительной потере клеток. При криоконсервировании клеток используются непроницающие в клетки осмотически активные компоненты среды замораживания, зачастую – различные сахара. Цель данной работы – исследование целесообразности использования олигосахаридов для подготовки МСК к криоконсервированию и для снижения концентрации ДМСО в криозащитной среде.

В работе использовали МСК дермы человека 4–7 пассажей. Сахарозу, трегалозу и рафинозу в концентрациях 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 и 0,5 М использовали для предобработки клеток до криоконсервирования, а также как добавку в криозащитную среду. Предобработку проводили путем культивирования клеток в течение суток с указанными концентрациями олигосахаридов. Охлаждение МСК осуществляли со скоростью 1 град/мин до –80°C, после чего образцы погружали в жидкий азот. Сохранность клеток определяли окрашиванием трипановым синим. Метаболическую активность оценивали по редокс-индикаторам МТТ и Alamar Blue. Адипогенную и остеогенную дифференцировку проводили в средах, содержащих специфические индукторы, и определяли по накоплению липидов, позитивно окрашивающихся Oil Red O, или по экспрессии клетками щелочной фосфатазы.

Криоконсервирование суспензий МСК, не прошедших предобработку, в среде без криопротекторов приводило к гибели более 90% клеток. Между показателями сохранности клеток и содержанием сахаров в исследуемом диапазоне концентраций в криозащитной среде и среде для предобработки установлена куполообразная зависимость. Предварительное культивирование МСК в присутствии любого из исследуемых олигосахаридов значительно повышало их криоустойчивость. Даже при полном отсутствии ДМСО и сыворотки около 50% предобработанных клеток после замораживания-отогрева сохраняли жизнеспособность, проявляли метаболическую активность и были способны к адгезии и пролиферации в условиях монослойного культивирования. Индукция клеток в адипогенном и остеогенном направлениях приводила к накоплению в них внутриклеточных липидов и экспрессии щелочной фосфатазы соответственно.

Полученные результаты указывают на целесообразность использования сахаров для разработки эффективных методов криоконсервирования МСК, исключающих применение токсичных концентраций криопротекторов и ксеногенной сыворотки.

Experimental and clinical applications of mesenchymal stromal cells (MSCs) require the development of new approaches and improvement of existing methods of cells cryopreservation. Cryoprotective solutions for effective freezing of MSCs usually contain 10% Me₂SO and fetal serum. These components must be removed after thawing and this often leads to significant cell loss. Various sugars are often used for cells cryopreservation as non-permeant osmotically active freezing media components. The aim of this study was to evaluate the feasibility of oligosaccharides using for the preparation of MSCs to cryopreservation and to reduce Me₂SO concentration in cryoprotective solution.

Human dermal MSCs of the 4–7th passages were used in this study. Sucrose, trehalose, and raffinose in concentrations of 0.05; 0.1; 0.2; 0.3 and 0.5 M were used for pretreatment of cells prior to cryopreservation and as an additive into the cryoprotective solution. Pretreatment was performed by one day cell culturing with indicated concentrations of oligosaccharides. MSCs were cryopreserved using the cooling rate of 1 deg/min down to –80°C, and following plunging into liquid nitrogen. Cell survival was determined by trypan blue staining. Metabolic activity of cells was assessed by redox indicators MTT and Alamar Blue (AB). Osteogenic and adipogenic differentiation was induced in media supplemented with specific differentiation factors and determined by the accumulation of lipids, positively stained with Oil Red O, or by expression of alkaline phosphatase.

Cryopreservation of MSC suspensions without pretreatment stage in a cryoprotectant free solution resulted in the death of more than 90% of cells. Dome-shaped dependence between rates of cell survival and sugars concentrations in cryoprotective solution and in culture medium for pretreatment was established. Pretreatment of MSCs with any of the studied oligosaccharides resulted in a significant increase in their cryostability. 50% of pretreated cells after freezing in the absence of Me₂SO and serum preserved their survival and metabolic activity and were able to attach and proliferate during monolayer culture. Induction of cells into adipogenic and osteogenic direction led to lipid intracellular accumulation and expression of alkaline phosphatase, respectively.

The obtained results indicate the feasibility of using sugars for the development of effective cryopreservation methods, which exclude the application of toxic concentrations of cryoprotectants and xenogeneic serum.

