

Витрификация стволовых клеток

А. ХЕЛБИГ, Я. НААЛДЖИК, А. ШТОЛЦИНГ

Институт клеточной терапии и иммунологии, Лейпциг, Германия

Vitrification of Stem Cells

A. HELBIG, Y. NAALDIJK, A. STOLZING

Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Leipzig, Germany

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – мультипотентные клетки-предшественники, выделенные из костного мозга и способные к самообновлению. Показано, что МСК могут дифференцироваться во многие типы клеток: адипоциты, хондроциты, остеоциты, гепатоциты, кардиомиоциты и нейроны.

Мезенхимальные стволовые клетки можно сохранять с помощью криобиологических методов, скорость их пролиферации и остеогенный потенциал после размораживания остаются нормальными, что делает возможным их будущее использование уже при существующих терапевтических подходах. Эксперименты на животных по восстановлению поврежденных тканей (хрящ, кость, мышцы, мышцы сердца и связки) с использованием МСК показали их перспективность при лечении заболеваний человека.

Жизнеспособность клеток или тканей после криоконсервирования ниже таковой для свежих клеток и тканей. При криоконсервировании такие факторы, как флуктуация температуры при замораживании и оттаивании, сочетание криопротекторов приводят к повреждению клеток и тканей.

Диметилсульфоксид (ДМСО), один из наиболее используемых в клинической практике криопротекторов, является токсичным для клеток и вызывает побочные эффекты при введении пациенту. Поэтому было бы целесообразно полностью исключить ДМСО.

Цель исследования – определение способа криоконсервирования, сохраняющего стволовые клетки, повышающего их жизнеспособность и потенциал дифференцировки после замораживания, с использованием современных методов; идентификация новых комбинаций криопротекторов для минимизации токсичности и устранения необходимости отмывания ДМСО перед применением клеток.

Мы сравним классическое криоконсервирование и контролируемые методы замораживания с витрификацией, используя различные растворы криопротекторов.

Используя устройство CryoMed с контролируемой скоростью замораживания, мы можем применять в работе различные протоколы замораживания. После замораживания клеток в образцах мы будем определять выживаемость клеток, используя тест на окрашивание трипановым синим, измерять пролиферацию клеток с помощью стандартного теста МТТ, а также анализировать способность стволовых клеток к дифференцировке с помощью КОЕ-ф, количественной АЛФ и измерения метиленового синего.

Мы будем использовать МСК человека/крысы и фибробласты. Эксперименты будут проводиться на клетках между 2-м и 4-м пассажами. Будут сравниваться различные криопротекторы, проникающие в клетку (ДМСО, глицерин, пропандиол) и непроникающие (пропиленгликоль и этиленгликоль).

Установлены и проверены специальные протоколы для различных типов клеток. Мы смогли определить протоколы, исключаящие необходимость отмывания и использования сыворотки в криосредах, что повысит успешность трансплантаций и уменьшит осложнения и побочные эффекты.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells isolated from the bone marrow and they have the capacity for self-renewal. MSCs have been shown to be capable of differentiating into multiple cell types such as adipocytes, chondrocytes, osteocytes, hepatocytes, cardiomyocytes and neurons.

MSCs can be preserved by cryopreservation and their proliferation rate and osteogenic potential seems to be normal after thawing, thus allowing for future “off-the-shelf” therapy approaches. Animal trials looking at reconstitution of damaged tissues such as cartilage, bone, muscle, heart muscle and tendon using MSCs have shown great promises for the use in human treatment.

Cell or tissue viability after cryopreservation is lower compared to fresh cells and tissues. Several factors interfere with cryopreservation leading to cell and tissue damage such as, fluctuation in the temperature during the freezing and thawing of the cells, use of inadequate cryoprotectant combinations.

Absence of the cryoprotectant DMSO (dimethylsulfoxide), one of the most used cryoprotectant known in clinical applications, is toxic for the cell and causes side effects when injected into patient. It would be very useful if DMSO could be eliminated completely.

The aim of our study is to determine a cryopreservation method to conserve stem cells and to improve their viability and differentiation potential after freezing using current methods. New cryoprotectant mixtures need to be identified in order to minimize toxicity and to eliminate the need for washing off the DMSO before transfer into a patient.

Classical cryopreservation and controlled freezing methods will be compared to vitrification using different cryoprotectant solutions.

By using the controlled rate freezing machine from CryoMed we are able to work with different freezing protocols. After freezing the cells, assays will be performed to determine cell viability using the trypan blue assay, measure cell proliferation by MTT assay, and the ability of the stem cells to differentiation will be analyzed by CFU-f and quantitative ALP and methylene blue measurement.

We will use human/rat MSC and fibroblasts. Experiments will be performed using cells between passage 2 and 4. Different cryoprotectants penetrating cells (DMSO, glycerol, propandiol) and non-penetrating (propylene glycol and ethylene glycol) will be compared.

Specific protocols for the different cells types were established and tested. We were able to set up protocols eliminating the need for washing and use of serum in the cryomedia. This will improve the transplantation success in patients and minimize complications and side effects.