

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер

А.И. ПРАВДИЮК, Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков

Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells in Alginate Microbeads

A.I. PRAVDYUK, YU.A. PETRENKO

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

Инкапсуляция клеток в альгинатные микросферы является перспективным направлением клеточной биотехнологии, тканевой инженерии и трансплантологии. Благодаря своей структуре альгинатный гидрогель позволяет инкапсулированным клеткам обмениваться питательными веществами, продуктами метаболизма, сигнальными молекулами и терапевтическими агентами с окружающей средой и в то же время обеспечивает иммуноизоляцию инкапсулированных клеток. Культивирование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в составе альгинатных микросфер позволяет изучать некоторые свойства этих клеток, которые не проявляются при монослойном культивировании. К таким свойствам можно отнести, например, способность к индуцированной хондрогенной дифференцировке. При изучении свойств МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы, необходима разработка эффективных методов их криоконсервирования для дальнейшего накопления и долгосрочного хранения.

В данной работе проведено сравнительное изучение влияния криоконсервирования под защитой ДМСО на сохранность и метаболическую активность МСК человека в виде суспензии одиночных клеток и инкапсулированных в альгинатные микросферы.

Суспензию МСК человека помещали в 1,2%-й раствор альгината натрия, после чего с помощью сконструированного пневматического генератора капель распрыскивали в раствор CaCl_2 . Полученные альгинатные микросферы, содержащие МСК, а также исходную суспензию одиночных клеток замораживали по 2-этапной программе в среде, содержащей 5 или 10% ДМСО, а также 10% ЭТС. Образцы хранили в жидком азоте в течение недели, после чего отогревали на водяной бане при 40°C и отмывали от криопротектора.

После удаления криопротектора сохранность деконсервированных МСК оценивали по результатам двойного окрашивания флуоресцеин диацетатом и этидиум бромидом с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. О метаболической активности МСК судили по степени восстановления редокс-индикатора Alamar Blue при культивировании в течение 12 ч.

Установлено, что процедура инкапсуляции не оказывала существенного влияния на жизнеспособность и метаболическую активность МСК. После криоконсервирования под защитой как 5, так и 10% ДМСО альгинатные микросферы сохраняли структурную целостность, а заключенные в них МСК характеризовались жизнеспособностью и метаболической активностью, сопоставимыми с соответствующими показателями деконсервированной суспензии одиночных МСК.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности сохранения жизнеспособности и метаболической активности инкапсулированных в альгинатные микросферы МСК после криоконсервирования.

Encapsulation of cells into alginate microbeads is perspective trend of cell biotechnology, tissue engineering and transplantology. Due to its structure alginate hydrogel enables the encapsulated cells to exchange nutrients, metabolic products, signal molecules and therapeutic agents with environment and at the same time provides immune isolation of encapsulated cells. Culturing of mesenchymal stromal cells (MSCs) in alginate microbeads allows the studying of some properties of these cells, not manifesting during monolayer culturing. For instance, the ability to induced chondrogenic differentiation may be referred to such properties. When studying the properties of MSCs encapsulated in alginate microbeads the development of effective methods of their cryopreservation for further accumulation and long-term storage is necessary.

This study deals with comparative investigation of cryopreservation effect with DMSO protection on survival and metabolic activity of human MSCs as the suspension of single cells and those encapsulated into alginate microbeads.

Human MSCs suspension was placed into 1.2% sodium alginate solution, afterwards using the designed pneumatic generator of drops it was sprayed into CaCl_2 solution. The resulted alginate microbeads containing MSCs as well as initial suspension of single cells were frozen according to two-stage program in the medium containing either 5 or 10% DMSO, as well as 10% FBS. The samples were stored in liquid nitrogen during a week, afterwards they were thawed on water bath at 40°C and washed-out from cryoprotectant.

After cryoprotectants removal the integrity of thawed MSCs was assessed on the results of double staining with fluorescein diacetate and ethidium bromide using confocal laser scanning microscope. Metabolic activity of MSCs was judged on the degree of recovery of redox-indicator Alamar Blue during culturing for 12 hrs.

It has been established that encapsulation procedure did not render significant effect on viability and metabolic activity of MSCs. After cryopreservation under protection not only 5 but also 10% DMSO alginate microbeads preserved structural integrity and encapsulated in them MSCs were characterized with viability and metabolic activity, comparable with corresponding indices of frozen-thawed suspension of single MSCs.

The findings testify to the possible preservation of viability and metabolic activity of encapsulated into alginate microbeads MSCs after cryopreservation.