

Витрификация мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер

В.С. ЗАЙКОВ, Н.А. ТРУФАНОВА, А.И. ПРАВДИЮК, Ю.А. ПЕТРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Vitrification of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated in Alginate Microspheres

V.S. ZAIKOV, N.A. TRUFANOVA, A.I. PRAVDYUK, YU.A. PETRENKO
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Инкапсуляция клеток в макропористые альгинатные носители является перспективной областью клеточной биотехнологии, тканевой инженерии и трансплантологии. В связи с этим необходимо обратить внимание на исследование и разработку новых методов криоконсервирования, позволяющих хранить биоматериал в составе макропористых носителей длительное время.

Очевидно, традиционные технологии криоконсервирования клеточных суспензий, включающие сравнительно низкие концентрации проникающих криопротекторов и скорости охлаждения, не подходят для биоинженерных конструкций. Эти технологии разработаны для предотвращения образования внутриклеточного льда за счет выхода воды из клетки и ее кристаллизации в окружающей среде. Внеклеточная кристаллизация может повлиять на структуру носителя, что приведет к гибели включенных в него клеток. Криоконсервирование путем витрификации позволяет избежать кристаллизации как внутриклеточной, так и внеклеточной воды и связанных с этим повреждений клеток.

Цель исследования – изучение влияния криоконсервирования, основанного на витрификации, на целостность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток (МСК), инкапсулированных в альгинатные микросферы (АМ).

МСК кожи человека заключали в АМ и помещали в стандартные криопробирки. После 2-х этапов экспозиции с криозащитным раствором, содержащим 10% диметилсульфоксида, 20% этиленгликоля, 20% 1,2-пропандиола, 0,5 М сахарозы, который был ранее разработан нами для витрификации суспензии МСК и назван ДЭПС-1, образцы были заморожены путем погружения в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при 40°C и отмывали от криопротекторов путем помещения в 0,5 М раствор сахарозы с последующим добавлением раствора Хенкса. После удаления криопротекторов жизнеспособность МСК в составе АМ оценивали по двойному окрашиванию флуоресцеин диацетатом и этидиум бромидом с помощью флуоресцентной микроскопии. Метаболическую активность МСК оценивали по степени восстановления индикатора Alamar Blue™ и МТТ-тестом при культивировании в течение 24 ч.

Были определены оптимальные условия ступенчатой экспозиции и концентрации ДЭПС-1 для МСК в составе АМ. После криоконсервирования, включающего два этапа добавления ДЭПС-1 в оптимальных условиях, последующего быстрого охлаждения, отогрева и отмывки от криопротекторов МСК в составе АМ показана нормальная жизнеспособность и метаболическая активность.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности криоконсервирования МСК в составе АМ путем витрификации.

Encapsulation of cells in macroporous alginate carriers is a promising area of cell biotechnology, tissue engineering and transplantation. It is required to pay attention to the detailed study and development of the new methods of cryopreservation, allowing store biomaterial composed with macroporous carriers unchanged for a long time.

There is a reason to suppose that conventional technologies for cryopreservation of cell suspensions including the relatively low concentrations of penetrating cryoprotectants and cooling rate in the range 1–50°C/min are not suitable for bioengineering designs. These regimes were developed to prevent formation of intracellular ice due to release of water from the cell and its crystallization in the environment. However, extracellular crystallization may affect the structure of the carrier, which in turn will lead to the death of enclosed cells. Vitrification procedure may allow to avoid the crystallization of both intracellular and extracellular water and related cell injury.

The purpose of the study was to investigate the influence of cryopreservation protocol based on vitrification on the integrity and metabolic activity of mesenchymal stromal cells (MSCs) encapsulated in alginate microspheres.

The human skin MSCs were encapsulated in alginate microspheres and placed to standard cryovials. After 2 steps of exposure with cryoprotective solution containing 10% dimethyl sulfoxide, 20% ethylene glycol, 20% 1,2-propane diol, 0.5 M sucrose, which we developed recently for vitrification of MSCs in single cell suspension and called DEPS-1, samples were frozen by immersion into liquid nitrogen. Samples were warmed on water bath at 40°C and washed from cryoprotectants by placing in 0.5 M sucrose solution with subsequent adding of the Hanks' solution. After cryoprotectant removal the integrity of MSCs encapsulated in microspheres was assessed by double staining with fluorescein diacetate and ethidium bromide using fluorescence microscopy. The metabolic activity of MSCs was estimated by the reduction degree of indicator Alamar Blue™ and MTT-test when culturing for 24 h.

Optimal conditions of stepwise exposure and concentration of DEPS-1 for MSCs within the alginate microspheres were determined. After cryopreservation including 2 step addition of DEPS-1 in revealed optimal conditions, following rapid cooling, warming and removing the cryoprotectants the alginate encapsulated MSCs significantly kept viability and metabolic activity.

The obtained results demonstrate the availability of vitrification protocol for cryopreservation of alginate encapsulated MSCs.