

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток человека с использованием сахарозы

В.В. МУЦЕНКО¹, Ю.А. ПЕТРЕНКО²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Human Mesenchymal Stromal Cells Using Sucrose

V.V. MUTSENKO¹, YU.A. PETRENKO²

¹V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Для криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток (МСК) обычно используются криозащитные среды, включающие 10% ДМСО и эмбриональную сыворотку ксеногенного происхождения, которые приходится удалять перед введением, что вносит дополнительный технологический этап, часто приводящий к значительной потере клеток. Сахароза часто используется при криоконсервировании клеток в качестве непроницающего нетоксичного осмотически активного компонента. В данной работе исследовали некоторые подходы использования сахарозы для снижения концентрации ДМСО при криоконсервировании МСК человека.

В работе использовали МСК, полученные с письменного согласия информированных доноров, культивированные в течение 4–7 пассажей. Сахарозу в концентрациях 0,1; 0,15 и 0,2 М использовали для предобработки клеток до криоконсервирования, а также в качестве добавки к криозащитную среду. Предобработку проводили путем культивирования клеток в течение суток с указанными концентрациями сахарозы. Криоконсервирование МСК осуществляли со скоростью 1°C/мин до –80°C, после чего образцы погружали в жидкий азот. Сохранность клеток определяли путем окрашивания трипановым синим. Метаболическую активность оценивали с использованием редокс-индикаторов МТТ и Alamar Blue (AB).

Криоконсервирование МСК в культуральной среде при отсутствии ДМСО, сахарозы и сыворотки приводило к гибели более 90% клеток. Предобработка клеток сахарозой или ее добавление в эту среду замораживания практически не влияли на жизнеспособность клеток. Вместе с тем значительное количество (около 50%) предобработанных клеток, криоконсервированных в присутствии сахарозы, после отогрева сохраняли жизнеспособность и метаболическую активность, оцененную по МТТ- и АВ-тестам. В условиях монослойного культивирования криоконсервированные клетки были способны к адгезии и пролиферации. Дополнительное введение всего 1% ДМСО в сахарозосодержащую криозащитную среду после предварительной обработки клеток приводило к повышению жизнеспособности, метаболической и пролиферативной активности клеток до 65%, что сопоставимо с результатами, полученными при криоконсервировании МСК под защитой 10% ДМСО в присутствии сыворотки. Дальнейшее изучение механизма криозащитного действия сахарозы может послужить основой для разработки эффективных методов криоконсервирования, исключающих использование токсичных концентраций криопротекторов и ксеногенной сыворотки.

For the cryopreservation of mesenchymal stromal cells (MSC) the cryoprotective solutions, containing 10% Me₂SO and xenogeneic fetal serum are usually applied. To remove these components before infusion the additional technological step, which often leads to significant cell loss is needed. Sucrose is often used for cells cryopreservation as a non-permeant, osmotically active component. In this study some approaches of sucrose application for the reduction of Me₂SO concentration during MSC cryopreservation were investigated.

MSC, used in this study were obtained after a written donor's informed consent with further culturing during 4–7 passages. Sucrose, in concentrations 0.1; 0.15 and 0.2 M was used for the pre-treatment of cells prior to cryopreservation and as an additive into the cryoprotective solution. Pre-treatment was performed by one day culturing of cells with indicated sucrose concentrations. MSCs were cryopreserved using the cooling rate 1°C/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 MTT and Alamar Blue (AB) redox indicators.

Cryopreservation of MSC in culture medium without Me₂SO, sucrose and serum resulted in the death of more than 90% cells. Pre-treatment of cells with sucrose or its addition into the freezing medium did not visibly affect the viability of cells. At the same time, the significant amount (about 50%) of pre-treated cells, cryopreserved in the presence of sucrose preserved their survival and metabolic activity, assessed by MTT and AB-tests after thawing. During monolayer culture, cryopreserved cells were able to attach and proliferate. Additional inclusion of just 1% of Me₂SO into sucrose-containing cryoprotective medium after cells pre-treatment resulted in the increase of survival, metabolic and proliferative activity of cells up to 65% that is similar to the data, obtained after cryopreservation of MSC with 10% Me₂SO in the serum presence. Further investigation of the mechanism of the sucrose cryoprotective effect could serve as a basis for the development of the effective cryopreservation methods, which exclude the application of toxic concentrations of cryoprotectants and xenogeneic serum.