

Улучшение выживаемости клеток после криоконсервирования за счет альгинатной инкапсуляции

О. ГРИШКОВ, Н. ХОФМАНН, Б. ГЛАСМАХЕР

Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

Alginate Encapsulation Technology Improves Survival of Living Cells Post-Cryopreservation

O. GRYSHKOV, N. HOFMANN, B. GLASMACHER

Institute for Multiphase Processes, Leibniz University Hannover, Germany

Инкапсуляция живых клеток в полупроницаемые матрицы была предложена как наиболее перспективный метод лечения хронических заболеваний. Однако доступность некоторых типов клеток, таких как стволовые клетки человека, в свою очередь, увеличивает потребность в том, чтобы такие клетки хранились в течение длительного времени обычно с использованием метода криоконсервирования, которое может причинить вред клеткам. Полупроницаемые мембраны, выступая в качестве резервуаров для криопротекторов (КП), могут защитить клетки при криоконсервировании. Кроме того, небольшие микрокапсулы на основе альгината (300 мкм) имеют больше преимуществ по сравнению с более крупными в случае трансплантации и криоконсервирования благодаря большей удельной площади поверхности и меньшему содержанию воды в них.

В связи с этим нами показана возможность применения технологии инкапсуляции с использованием альгината для увеличения жизнеспособности клеток после криоконсервирования, а также для поддержания нормальной скорости их пролиферации после оттаивания. Фибробласты NIH 3T3 (5×10^6 кл/мл) были инкапсулированы в 1,5 или 2,0% (масса/объем) альгинатных микрокапсулах (диаметр ~250 мкм) в стерильных условиях с использованием технологии с высоким напряжением и ранее оптимизированных параметров. Криоконсервирование проводили с протоколом 2 К/мин до -30°C и при 5К/мин от -30 до -80°C , использовали среду DMEM с 20% FCS и 10% DMSO. Размораживание проводили при 20°C с использованием стандартного оборудования. Пролиферацию и жизнеспособность инкапсулированных клеток до криоконсервирования и после оттаивания оценивали с помощью тестов MTT и Calcein AM/Ethd соответственно. С помощью микроскопа «Carl Zeiss Axiovert 200M» при увеличении $5\times$ или $10\times$ и программы «AxioVision V 4.8.2.0» наблюдали за изменениями в морфологии альгинатных микрокапсул. Фибробласты NIH 3T3 инкапсулировали в альгинатные микрокапсулы при концентрации около 130 ± 24 клеток на капсулу. Предварительные результаты выживаемости клеток после инкапсуляции выявили, что электрораспыление является подходящим методом для заключения живых клеток. Микроскопические наблюдения показали, что низкотемпературная обработка и последующее оттаивание существенно не влияют на морфологию альгинатных капсул – они были стабильными и округлой формы. Результаты анализа жизнеспособности клеток показали увеличение жизнеспособности инкапсулированных клеток на 10% после криоконсервирования по сравнению с неинкапсулированными. Анализ пролиферации с MTT показал, что клетки делятся и после оттаивания. Для дальнейшего повышения жизнеспособности клеток необходимо найти наиболее подходящие методы замораживания-оттаивания, а также альтернативные и наиболее безопасные для клеток КП.

Encapsulation of living cells into semi-permeable matrices has been proposed as a most promising method to treat chronic disorders. However, the availability of some cell types such as human stem cells, in turn, promotes the need for such cells to be preserved for longer periods of time, commonly using cryopreservation procedures, which can cause injuries to the cells. Semi-permeable membranes might protect the cells during cryopreservation, serving as reservoirs for cryoprotective agents (CPAs). Additionally, smaller alginate-based micro-capsules (300 μm) offer more advantages over larger ones for transplantation and cryopreservation owing to higher specific surface area and less water content.

Herein we indicate the possibility for alginate-based encapsulation technology to improve the post-cryopreservation viability of living cells as well as to support their normal rate of proliferation after thawing. NIH 3T3 fibroblasts (5×10^6 cells/ml) were encapsulated into 1,5% or 2,0% (w/v) alginate micro-capsules (diameter ~250 μm) under sterile conditions using high-voltage processes based on previously optimized parameters. Cryopreservation was conducted under 2 K/min to -30°C and 5 K/min from -30°C to -80°C freezing protocol using DMEM, 20% FCS, 10% DMSO as freezing medium. Thawing was performed at 20°C using standardized equipment. The proliferation and viability of encapsulated cells before cryopreservation and after thawing was measured using MTT and Calcein AM/Ethd assays respectively. The change in morphology of alginate micro-capsules was observed under Carl Zeiss Axiovert 200M microscope using $5\times$ or $10\times$ magnifications and AxioVision V 4.8.2.0 built-in software.

NIH 3T3 fibroblasts cells have been encapsulated into alginate micro-capsules at a density of approximately 130 ± 24 cells per capsule. Preliminary results on cell survival after encapsulation found that electrospraying is a suitable technique for living cells entrapment. Microscopic observations showed that low temperature treatment and further thawing did not significantly affect the morphology of alginate capsules - they appeared to be stable and round in shape. The results of cell viability assays indicated an increase in viability of encapsulated cells post-cryopreservation as compared to non-encapsulated by 10%. The MTT proliferation assay showed that cells proliferate well after thawing. In order to further improve the viability of cells, the most suitable freezing and thawing protocol as well as the finding of alternative and less-harmful for the cells CPAs are of necessary and will supplement this study.