

Хранение инкапсулированных сфероидов, состоящих из клеток печени, при -80°C после хранения при температуре жидкого азота

P. Kilbride¹, C. Selden¹, B. Fuller², J. Morris³

¹UCL Institute for Liver and Digestive Health, Royal Free Hospital Campus, London, UK

²UCL Department of Surgery, Royal Free Hospital Campus, London, UK

³Asymptote Ltd., St. John's Innovation Centre, Cambridge, UK

Storage of Encapsulated Liver Cell Spheroids at -80°C after Storage at Liquid Nitrogen Temperatures

P. Kilbride¹, C. Selden¹, B. Fuller², J. Morris³

¹UCL Institute for Liver and Digestive Health, Royal Free Hospital Campus, London, UK

²UCL Department of Surgery, Royal Free Hospital Campus, London, UK

³Asymptote Ltd., St. John's Innovation Centre, Cambridge, UK

Необходимым условием клинического применения многих биоинженерных тканей является их криоконсервирование и отогрев при первой необходимости. В данном случае может возникнуть вопрос относительно адекватного способа транспортировки таких тканей в отогретом либо криоконсервированном виде.

В работе изучено влияние различных вариантов хранения перед отогревом инкапсулированных в альгинате сфероидов из клеток печени (иСКП), предназначенных для использования в аппарате искусственной печени [1]. Целью исследования было моделирование транспортировки иСКП при температурах жидкого азота (-196°C) или сухого льда (-80°C).

Криоконсервированные при температуре жидкого азота иСКП отогревали и хранили при -80°C в течение 1, 4 или 8 суток перед оттаиванием либо оттаивали сразу после извлечения из жидкого азота без промежуточного хранения при -80°C . Через 72 ч после размораживания количество жизнеспособных клеток (определенное в тесте с окрашиванием пропидий иодидом/флуоресцеин диацетатом [1, 2]) составляло ($74,03 \pm 8,35$), ($46,03 \pm 1,96$), ($55,14 \pm 3,65$) и ($1,93 \pm 0,62$) млн кл/мл соответственно после отогрева без хранения при -80°C , а также хранения при -80°C в течение 1, 4 и 8 суток. Содержание альфа-1-фетопротеина [2] через 2-е суток после размораживания составило ($56,3 \pm 0,6$) нг/мл иСКП/24 ч в образцах без хранения при -80°C , ($3,1 \pm 0,3$) нг/мл иСКП/24 ч – после суток хранения при -80°C . В образцах, хранившихся при -80°C больше суток содержание данного белка было незначительным. Установлено, что пребывание при -80°C после хранения при -196°C (моделирование транспортировки в сухом льду) вызывает существенное повреждение иСКП по сравнению с отогретыми непосредственно после извлечения из жидкого азота без промежуточного хранения при -80°C . При любом варианте хранения при -80°C (после пребывания в жидком азоте) снижается жизнеспособность и общее количество клеток, потребление глюкозы и синтез альфа-1-фетопротеина.

Таким образом, аппарат искусственной печени, содержащий деконсервированные сфероиды из клеток печени, инкапсулированные в альгинате, может использоваться после транспортировки при температурах ниже температуры сухого льда либо после транспортировки в отогретом состоянии.

1. Erro E. et al. *Bioengineering the Liver: Scale-Up and Cool Chain Delivery of the Liver Cell Biomass for Clinical Targeting in a Bioartificial Liver Support System*. *BioResearch Open Access* 2013; 2(1): 1–11.

2. Kilbride P. et al. *A scale down process for the development of large volume cryopreservation*. *Cryobiology* 2014; 69(3): 367–375.

For many bioengineered tissues to have feasible clinical application, they must be cryopreserved for future thaw on demand. This raises the important question of transport of these tissues – either transport thawed or still cryopreserved is an option.

This study examined different thermal histories on warming to mimic transport at liquid nitrogen (-196°C) or dry ice (-80°C) temperatures of alginate encapsulated liver spheroids (ELS) for use in a bioartificial liver device (BAL) [1].

ELS cryopreserved at LN_2 temperatures were warmed to and held at -80°C for either 1, 4, or 8 days prior to thaw, and this was compared to ELS thawed directly from LN_2 with no stop at -80°C . At 72 h post thaw, viable cell number, determined through PI/FDA staining [1, 2] was recorded at (74.03 ± 8.35) million cells/ml, (46.03 ± 1.96) million cells/ml, (55.14 ± 3.65) million cells/ml, and (1.93 ± 0.62) million cells/ml for samples experiencing no hold at -80°C , a 1 day hold at -80°C , a 4 day hold at -80°C , and an 8 day hold at -80°C , respectively. Alpha-1-fetoprotein production was measured [2] at (56.3 ± 0.6) ng/ml ELS/24 h at 2 days post thaw for samples experiencing no hold at -80°C , this compares with (3.1 ± 0.3) ng/ml ELS/24 h in samples experiencing a 1 day hold at -80°C , and protein production was negligible in samples held at -80°C for periods greater than 1 day. It is determined that holding at -80°C after -196°C storage (mimicking dry ice transport) leads to ELS expressing heavy damage over those thawed directly from liquid nitrogen. Any storage at -80°C after -196°C storage results in lower cell viability, cell count, glucose consumption and alpha-1-fetoprotein production.

We conclude that for a bioartificial liver device composed of alginate encapsulated liver spheroids to be used after cryopreservation, it requires transport below dry ice temperatures or must be thawed prior to transport.

1. Erro E. et al. *Bioengineering the Liver: Scale-Up and Cool Chain Delivery of the Liver Cell Biomass for Clinical Targeting in a Bioartificial Liver Support System*. *BioResearch Open Access* 2013; 2(1): 1–11.

2. Kilbride P. et al. *A scale down process for the development of large volume cryopreservation*. *Cryobiology* 2014; 69(3): 367–375.

