

Разработка стратегии криоконсервирования эквивалента роговицы человека

И. БЕРНЕМАНН¹, С. РАЙХЛ², Б. ГЛАСМАХЕР¹, Н. ХОФМАНН¹

¹Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

²Институт фармацевтической технологии, Технический университет Брауншвейга, Брауншвейг, Германия

Development of a Cryopreservation Strategy for a Human Corneal Equivalent

I. BERNEMANN¹, S. REICHL², B. GLASMACHER¹, N. HOFMANN¹

¹Institute for Multiphase Processes, Leibniz Universitaet Hannover, Hannover, Germany

²Institute for Pharmaceutical Technology, Technische Universitaet Braunschweig, Braunschweig, Germany

В настоящее время криоконсервирование является единственным методом длительного хранения клеток и тканей. Однако эффективность охлаждения и оттаивания тканей и продуктов тканевой инженерии вызывают интерес. Так, до сих пор не определены успешные стратегии криоконсервирования роговицы человека. Целью этого исследования является разработка протокола эффективной транспортировки и хранения эквивалента «полуроговицы» (hemisocornea) человека, который используется как модель *in vitro* для исследования трансроговичного всасывания препаратов.

В первую очередь мы использовали разработанный системный подход для оптимизации параметров охлаждения и оттаивания для каждого типа клеток конструкции «полуроговицы», что важно для эффективного криоконсервирования. Скорость охлаждения 0,2 К/мин, использованная для эпителиальных клеток роговицы человека (HCE-T-клетки), обеспечила высокую выживаемость, а в случае кератиноцитов человека (HCK-Ca-клеток) оптимальной была скорость охлаждения от 5 до 10 К/мин. Несмотря на эту разницу, приемлемая выживаемость обоих клеточных компонентов может быть достигнута путем подбора как состава криопротекторов, так и концентрации их смесей. Результаты исследования использовали в экспериментах по криоконсервированию «полуроговичных» 3D-конструкций. В соответствии с протоколом можно сохранить основные свойства относительно важных барьерных характеристик этой модели *in vitro*, которые были оценены путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления и проницаемость Na-флуоресцеина как маркерного вещества. Данные барьерной функции эпителия показали, что полученные результаты позволяют разработать эффективный протокол низкотемпературного хранения конструкции «полуроговицы» человека. Кроме того, в будущем это даст новые возможности для создания низкотемпературных банков роговиц.

Это исследование финансируется Федеральным институтом оценки рисков (BFR) в рамках гранта №1328-488.2. Мы благодарим М. Ханэ и А. Бринкманна за помощь в создании полуроговичной конструкции.

Currently, cryopreservation is the only method for long-term storage of living cells and tissues. However effective cooling and thawing of tissue and tissue engineered products pose a specific challenge. Due to this so far no successful cryopreservation strategy for human cornea is established. Aim of this project was to develop a protocol for effective transport and storage of a human hemi-cornea equivalent that is used as *in vitro* model for transcorneal drug absorption studies.

Since effective cryopreservation requires optimization of cooling and thawing parameters for every cell type we firstly used a systematic approach to optimize these conditions for the 2 different cell types of the hemi-cornea construct. For human corneal epithelial cells (immortalised HCE-T cells) a cooling rate of 0,2 K/min led to the highest survival rates whereas human keratinocytes (HCK-Ca cells) showed optimal survival with cooling rates of 5 to 10K/min. Despite this discrepancy acceptable cell survival of both cellular components could be achieved by adaption the cryoprotective agent (CPA) both regarding the composition and the concentration of the CPA mixture. The findings are transferred to the cryopreservation experiments with the 3D hemi-cornea constructs. With the applied protocol the main properties with respect to the important barrier characteristics of the *in vitro* model could be maintained. This was evaluated by measuring the transepithelial electrical resistance and permeation of Na-fluorescein as marker substance. The data for the epithelial barrier function showed promising results to develop an effective protocol for a low temperature storage of the human hemi-cornea construct. Furthermore this will offer new options for corneal graft banking in the future.

This work is supported by funding from the German Federal Institute for Risk Assessment (BFR) under the grant no. 1328-488.2. We thank M. Hahne and A. Brinkmann for their support with HCC construction.