

# Тромбоцитарный лизат повышает эффективность криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток

Е.Ю. Роговская, Ю.А. Петренко

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

## Platelet Lysate Enhances Efficiency of Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells

E.Yu. Rogulska, Yu. A. Petrenko

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

Применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в клинической практике связано с необходимостью стандартизации и оптимизации протоколов культивирования и долгосрочного хранения. Для повышения биологической безопасности клеточных препаратов согласно нормам и правилам GMP требуется минимизировать их контакт с ксеногенными и токсичными компонентами. Криозащитные среды для эффективного замораживания МСК обычно содержат 10% ДМСО и эмбриональную сыворотку (ЭС), которые следует удалять перед инфузией, что, в свою очередь, не только связано со значительными затратами времени, но и приводит к потере части клеток. В связи с этим целью работы было исследование целесообразности применения тромбоцитарного лизата (ТЛ) в качестве альтернативы ксеногенной ЭС в среде культивирования и криоконсервирования.

В работе использовали МСК жировой ткани человека 4–6 пассажей. Экспансию клеток проводили в среде  $\alpha$ -MEM, дополненной 10% ЭС или 10% ТЛ. Для подготовки клеток к криоконсервированию за 24 ч до замораживания в среду культивирования вносили 100 мМ сахарозы. В качестве среды для криоконсервирования использовали  $\alpha$ -MEM, содержащую 200 мМ сахарозы и/или 10% ЭС и 10% ТЛ. Криоконсервирование МСК осуществляли со скоростью 1 град/мин до  $-80^{\circ}\text{C}$ , после чего образцы погружали в жидкий азот. Сохранность клеток определяли окрашиванием трипановым синим. Метаболическую активность оценивали по редокс-индикаторам МТТ и Alamar Blue. Для оценки эффективности колониеобразования подсчитывали число колоний, определяли их размер и клеточность. Направленную адипо- и остеогенную дифференцировку выявляли по накоплению липидов или экспрессии клетками щелочной фосфатазы.

Ранее нами было установлено, что предварительное культивирование МСК в присутствии сахарозы способствовало значительному повышению их устойчивости к криоповреждению. Около 45% предобработанных сахарозой и культивированных в среде с ЭС клеток после замораживания-отогрева в отсутствие ДМСО сохраняло жизнеспособность и метаболическую активность. Введение ТЛ в состав среды криоконсервирования улучшало показатели жизнеспособности на 10–15%. Использование ТЛ в качестве альтернативы ЭС в среде культивирования приводило к усилению пролиферации, эффективности колониеобразования и остеогенной дифференцировки МСК. Кроме того, экспансия МСК в среде, дополненной ТЛ, позволяла увеличить сохранность до 63%. Клетки после культивирования и криоконсервирования с ТЛ сохраняли способность к адгезии, пролиферации и дифференцировке в остео- и адипогенном направлениях. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что тромбоцитарный лизат повышает эффективность криоконсервирования МСК.

Clinical application of mesenchymal stromal cells (MSCs) requires the development of standardized and optimal protocols for cell culture and long term storage. To improve the biological safety of cell products in accordance to GMP standards their contact with xenogeneic and toxic components needs to be minimized. Cryoprotective solutions for effective freezing of MSCs usually contain 10% Me<sub>2</sub>SO and fetal serum (FS). These components should be removed before infusion that is not only time consuming process but also leads to a significant cell loss. Therefore the aim of this study was to evaluate the feasibility of platelet lysate (PL) application as an alternative to xenogeneic FS in culture and cryopreservation media.

Human adipose tissue-derived MSCs of the 4–6<sup>th</sup> passages were used in this study. Cell expansion was carried out in  $\alpha$ -MEM, supplemented with 10% FS or 10% PL. Sucrose in concentration of 100 mM was added to the culture medium 24 hrs prior to cryopreservation for cell pretreatment. The basic composition of the cryopreservation medium was  $\alpha$ -MEM supplemented with 200 mM sucrose and/or 10% FS and 10% PL. MSCs were cooled with the rate of 1 deg/min down to  $-80^{\circ}\text{C}$ , following by plunging into liquid nitrogen. Cell survival was determined by trypan blue staining. Metabolic activity of cells was assessed by redox indicators MTT and Alamar Blue. To evaluate colony forming efficiency the number of colonies and their size were determined. Induced adipogenic and osteogenic differentiation was determined by the accumulation of lipids or by the alkaline phosphatase expression.

We have shown previously that the pretreatment of MSCs with sucrose resulted in a significant increase of their resistance to the cryodamage. About 45% of pretreated with sucrose and cultured in medium with FS cells after freezing in the absence of Me<sub>2</sub>SO preserved their survival and metabolic activity. Inclusion of PL into the cryopreservation medium improved cell survival by 10–15%. The application of PL as an alternative to FS in the culture medium increased proliferation, colony forming efficiency and osteogenic differentiation of MSCs. Moreover, the expansion of MSCs in a medium supplemented with PL allowed improving cell viability after cryopreservation up to 63%. MSCs after culture and cryopreservation with PL were able for attachment, proliferation and multilineage differentiation towards osteogenic and adipogenic lineages. The obtained results suggest that platelet lysate enhances the efficiency of MSCs cryopreservation.

