

## **Инкапсуляция клеток в альгинатные микросферы снижает токсическое действие криопротекторов при витрификации**

В.С. Зайков, В.В. Муценко, Д.Н. Тарусин, Ю.А. Петренко

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

## **Encapsulation of Cells into Alginate Microspheres Reduces Toxic Effect of Cryoprotectants During Vitrification**

V.S. Zaikov, V.V. Mutsenko, D.N. Tarusin, Yu.A. Petrenko

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

Витрификация трехмерных тканеинженерных конструкций – перспективный криобиологический подход, позволяющий сохранить как жизнеспособность и функциональные свойства клеток, так и структурные особенности и трехмерную организацию биообъекта. Многообещающим направлением тканевой инженерии является инкапсуляция клеток в альгинатные носители. Ранее нами было установлено, что для успешной витрификации инкапсулированных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) необходимо проводить более длительную экспозицию с раствором криопротекторов по сравнению с суспензией клеток. При этом более продолжительная экспозиция значимо не влияла на морфофункциональные свойства инкапсулированных МСК и позволяла получить высокие показатели их жизнеспособности после витрификации. Это может быть связано с тем, что инкапсуляция в альгинатные носители снижает негативное действие криопротекторов на этапе экспозиции.

Целью данной работы было изучить влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы на жизнеспособность МСК после экспозиции и витрификации в многокомпонентных растворах криопротекторов.

В работе использовали МСК дермы взрослого человека 6–8 пассажей. В качестве криозащитных сред было выбрано 5 растворов: раствор 1 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы; 20% ЭГ и 20% ПД (8,45 М); раствор 2 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы и 30% ЭГ (7,31 М); раствор 3 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы и 40% ЭГ (9 М); раствор 4 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы и 50% ЭГ (10,88 М); раствор 5 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы и 60% ЭГ (12,68 М).

Экспозицию инкапсулированных клеток с растворами криопротекторов проводили в течение 5 мин при 20°C. Образцы замораживали путем прямого погружения в жидкий азот (–196°C). Жизнеспособность МСК до и после криоконсервирования оценивали с использованием МТТ-теста.

Было установлено, что жизнеспособность МСК в суспензии после экспозиции с растворами криопротекторов снижалась при увеличении общей молярной концентрации раствора. При этом экспозиция клеток в растворе 5 приводила к полной потере жизнеспособности клеток. Напротив, уровень жизнеспособности инкапсулированных МСК после экспозиции с каждым из растворов оставался выше 70%. При этом использование криозащитных растворов с более высокой общей молярной концентрацией позволило добиться близких показателей жизнеспособности инкапсулированных МСК до и после замораживания-оттаивания.

Полученные данные свидетельствуют о том, что инкапсуляция МСК в альгинатные носители позволяет снизить негативное действие растворов криопротекторов, проводить более длительную экспозицию в данных растворах и, в результате, повысить эффективность криоконсервирования.

Vitrification of three-dimensional tissue-engineered constructs is a promising cryobiological approach that allows preserving both the viability, functional properties of cells and structural features and three-dimensional organization of bioobject. Cell encapsulation into alginate carriers is a promising direction of tissue engineering. Previously, we have established that a successful vitrification of encapsulated mesenchymal stromal cells (MSCs) needs more prolonged exposure with cryoprotectant solution if compared with cell suspension. In this case more prolonged exposure did not significantly affect the morphofunctional properties of encapsulated MSCs and allowed to achieve high viability indices after vitrification. This may be due to the fact that encapsulation into alginate carriers reduces a negative effect of cryoprotectants at exposure stage.

The aim of this work was to study the effect of encapsulation into alginate microspheres on MSCs viability after exposure and vitrification in multicomponent cryoprotectant solutions.

We used MSCs of adult human derma of 6–8 passages. As cryoprotective media there were selected 5 solutions: solution 1 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose; 20% EG, and 20% PD (8.45 M); solution 2 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose and 30% of EG (7.31 M); solution 3 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose and 40% of EG (9 M); solution 4 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose and 50% EG (10.88 M); solution 5 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose and 60% EG (12.68 M).

The exposure of encapsulated cells with cryoprotectant solutions was carried out for 5 min at 20°C. Samples were frozen by direct immersion into liquid nitrogen (–196°C). MSCs viability before and after cryopreservation was assessed using the MTT assay.

The viability of MSCs in the suspension after exposure with cryoprotectant solutions was established to decrease with increasing the total molar concentration of the solution. In this case the cell exposure in the solution 5 resulted in a complete loss of cell viability. In contrast, the viability level of encapsulated MSCs after exposure with each of the solutions remained above 70%. The use of cryoprotective solutions with higher total molar concentration enabled to achieve close indices of viability of encapsulated MSCs prior to and after freeze-thawing.

The findings suggest that MSCs encapsulation into alginate carriers allows to reduce a negative effect of cryoprotective solutions, to implement more prolonged exposure in these solutions and, as a result, to improve the efficiency of cryopreservation.

