

Дифференцировка криоконсервированных стромальных клеток костного мозга в альгинатных микроносителях

Differentiation of Cryopreserved Bone Marrow Stromal Cells in Alginate Microcarriers

Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ) способны к мультилинейной дифференцировке *in vivo* и *in vitro* под действием определенных сигнальных веществ. Благодаря этому свойству МСК КМ являются ценным источником информации при расшифровке механизмов клеточной специализации, перспективным объектом заместительной и регенеративной медицины, а также компонентом биоинженерных конструкций, прототипов искусственных органов и тканей в тканевой инженерии.

Классический метод культивирования адгезивных клеток – монослойная система, в которой клетки ориентированы в двухмерном пространстве, тогда как в организме они имеют трехмерную ориентацию. Установлено, что трехмерная система культивирования обеспечивает более естественные условия для клеток по сравнению с традиционной монослойной культурой [5–7]. Одной из наиболее привлекательных моделей для трехмерного культивирования являются альгинатные микроносители.

Альгинат натрия – линейный полисахарид, состоящий из β -D-манурановой и α -L-гулурановой кислоты, растворимый в водных или буферных солевых растворах. Клетки, внесенные в раствор альгината натрия, могут быть гомогенно распределены в суспензии. Альгинат натрия полимеризуется в присутствии ионов кальция, бария, магния, образуя пористый гидрогель. Размер пор гидрогеля позволяет диффундировать кислороду, питательным веществам, сигнальным молекулам, но препятствует прохождению более крупных молекул (например, иммуноглобулинов), что обеспечивает иммунологическую защиту инкапсулированного в микроноситель биологического материала. Альгинатный гидрогель обладает достаточной механической прочностью и способен деградировать в организме человека без образования токсических продуктов.

Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM MSCs) are capable for *in vivo* and *in vitro* multilinear differentiation under certain signal substance effect. Due to this property BM MSCs are the valuable information source in decoding cell specialisation mechanisms, a perspective object for substitutive and regenerative medicine, as well as a component of bioengineered constructions, prototypes of artificial organs and tissues in tissue engineering.

The monolayer system, where cells are oriented in 2D space, is the standard culturing method for adhesive cells, meanwhile they are 3D-orientated in an organism. The 3D culturing system was established as providing more natural conditions for cells than the standard monolayer culture [5–7]. One of the models for 3D culturing is alginate microcarriers.

Sodium alginate is a linear polysaccharide, comprising β -D-mannuronic and α -L-hyaluronic acids, soluble either in aqueous or buffer saline solutions. Cells, introduced into sodium alginate solution may be homogeneously distributed in suspension. Sodium alginate is polymerised at calcium, barium, magnesium ion presence with porous hydrogel formation. Hydrogel pore size enables a diffusive process of oxygen, nutritive substances, signal molecular but prevents passage of larger molecules (immunoglobulins, for example), that provides an immunological protection for biological material, encapsulated into microcarrier. An alginate hydrogel is quite a solid and capable to degrade in human organism with no toxic product formation.

Multipotent stem cells are known as capable to lose their unique properties (capability to self-renewal and differentiated potential) as a result of either long-term culturing or under stress factors [2–4]. It is of common knowledge that cells are subjected to different physical and chemical stress effects under cryopreservation. At the same time the question about the effect of cryopreservation factors on BM MSCs properties under culturing in 3D carriers has still remained unstudied.

Известно, что мультипотентные стволовые клетки могут утрачивать свои уникальные свойства (способность к самообновлению и дифференцировочный потенциал) в результате длительного культивирования или под воздействием стрессовых факторов [2–4]. Известно, в ходе криоконсервирования клетки подвергаются различным физико-химическим стрессовым воздействиям. При этом вопрос о влиянии факторов криоконсервирования на свойства МСК КМ при культивировании в трехмерных микроносителях остается неизученным.

Цель работы – исследование влияния криоконсервирования и длительного хранения на способность МСК КМ к мультилинейной дифференцировке при культивировании в составе альгинатных микроносителей.

Материалы и методы

Стромальные клетки, полученные из костного мозга взрослого человека, культивировали в монослое. После 2-го пассажа клетки снимали с культурального пластика и криоконсервировали в криобирках объемом 1 мл под защитой 10%-го ДМСО путем медленного замораживания со скоростью 1°C/мин до –80°C. Криоконсервированные образцы хранили в жидком азоте в течение 9 месяцев. После хранения клетки отогревали на водяной бане при 37°C и культивировали в течение 2-х пассажей в монослое.

Сохранность клеток определяли по окрашиванию витальным красителем трипановым синим.

По окончании этапа монослойного культивирования клетки снимали с культурального пластика и переводили в 1,2%-й раствор альгината натрия (Sigma). При помощи специально сконструированной установки суспензию по капельно вносили в раствор хлорида кальция для полимеризации альгината. Полученные микроносители отмывали и использовали для дальнейших экспериментов.

Для индукции адипо- и хондрогенной дифференцировки клетки в составе микроносителей культивировали в течение четырех недель в средах, которые содержали ростовые факторы, стимулирующие адипогенез (Stem Cell Technologies Inc.) и хондрогенез (Cambrex). После культивирования инкапсулированные клетки фиксировали в формалине.

Адипогенную дифференцировку оценивали по накоплению нейтральных липидов, которые окрашивались Oil Red O. Маркер хондрогенной дифференцировки – коллаген типа II – выявляли методом непрямой иммуофлюоресценции с использованием первичных моноклональных антител к коллагену типа II (Chemicon) и вторичных меченых FITC-антител (Dako). Микрофотографии

The research was aimed to study the effect of cryopreservation and a long-term storage on BM MSCs ability for a multilinear differentiation under culturing as a part of alginate microcarriers.

Materials and methods

Stromal cells, derived from adult human bone marrow were cultured in a monolayer. After second passage cells were removed from a culture plastic and cryopreserved in 1 ml cryovials under 10% DMSO protection via slow freezing with 1°C/min rate down to –80°C. Cryopreserved samples were stored in a liquid nitrogen within 9 months. After storage the cells were thawed on water bath at 37°C and cultured during 2 passages into a monolayer.

Cell integrity was determined by staining with trypane blue vital dye.

After finishing the stage of monolayer culturing, we removed cells from a culture plastic and placed into 1.2% sodium alginate solution (Sigma). Using a specially designed device we introduced the obtained suspension drop by drop into the calcium chloride solution for alginate polymerisation. The obtained microcarriers were washed out and used for further experiments.

To induce the adipo- and chondrogenic differentiation we cultured cells as a part of microcarriers within 4 weeks in the media, containing growth factors, stimulating adipogenesis (Stem Cell Technologies Inc.) and chondrogenesis (Cambrex). After culturing the encapsulated cells were formalin fixed.

Adipogenic differentiation was estimated by accumulating the neutral lipids, stained with Oil Red O. Chondrogenic differentiation marker: II type collagen was revealed using the method of indirect immune fluorescence with primary monoclonal antibodies to the II type collagen (Chemon) and secondary labelled FITC antibodies (Dako). Microphotos were taken using Nikon digital phototocamera with Carl Zeiss Jena luminescent microscope.

Results and discussion

Stromal cells, derived from adult human bone marrow after the 4th passage were of normal fibroblast-like morphology and MSCs-intrinsic phenotype [1]. Under 2D culturing they are capable to differentiate into osteo- and adipogenic MSCs lineages [1]. Cell viability after trypsinization and cryopreservation was 95±3 and 85±4%, correspondingly. Cryopreserved cells were successfully adhered to culture plastic surface and flattened. BM MSCs transfer into alginate microcarriers (500–1000 μm) does not significantly affect the cell viability. Cells in alginate microcarriers were of roundish shape. During culturing in the differentiation inducer-free medium the morphology of encapsulated cells did not significantly change.

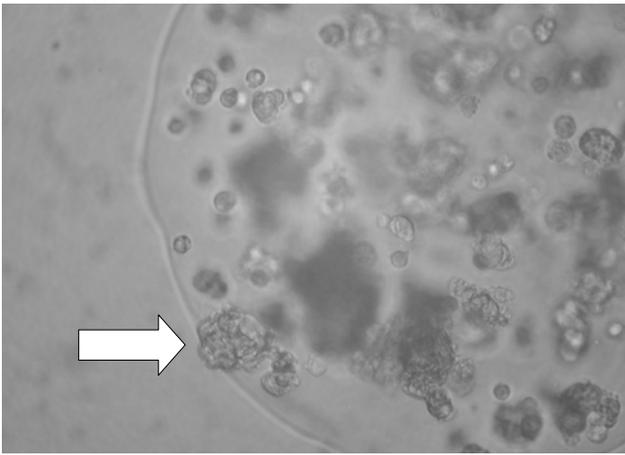


Рис. 1. Агрегация МСК КМ в альгинатных микроносителях при культивировании в среде, индуцирующей хондрогенез, $\times 200$.

Fig. 1. BM MSCs aggregation in alginate microcarriers during culturing in chondrogenesis-inducing medium, $\times 200$.

получены цифровой фотокамерой Nikon на люминисцентном микроскопе Carl Zeiss Jena.

Результаты и обсуждение

Стромальные клетки, полученные из костного мозга взрослого человека после 4-го пассажа, имели нормальную фибробластоподобную морфологию, фенотип, характерный для МСК [1]. В условиях двухмерного культивирования они способны дифференцироваться в остео- и адипогенном направлениях МСК [1]. Жизнеспособность клеток после трипсинизации составляла $95 \pm 3\%$, а после криоконсервирования – $85 \pm 4\%$. Криоконсервированные клетки успешно адгезировали к поверхности культурального пластика и распластывались. Перевод МСК КМ в альгинатные микроносители (500–1000 мкм) существенно не влиял на жизнеспособность клеток. Клетки в альгинатных микроносителях имели округлую форму. При культивировании в среде без индукторов дифференцировки морфология инкапсулированных клеток существенно не изменялась.

Известно, что в условиях двухмерного культивирования хондрогенная дифференцировка МСК КМ практически не реализуется. В течение первой недели культивирования криоконсервированных МСК КМ в составе микроносителей в среде, индуцирующей хондрогенез, отмечено образование клеточных агрегатов разных размеров и форм (рис. 1). При дальнейшем культивировании размер агрегатов увеличивался, через 28 суток они позитивно окрашивались на коллаген типа II.

Клетки в среде, индуцирующей адипогенез, с третьей недели культивирования накапливали в интрацеллюлярном пространстве нейтральные липиды (рис. 2), которые окрашивались Oil Red O. В

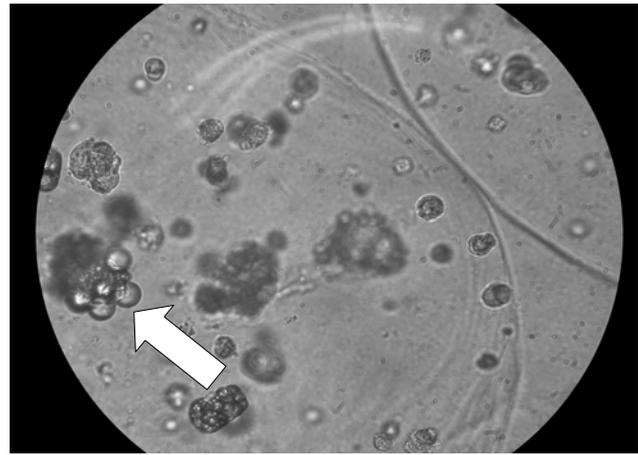


Рис. 2. Накопление нейтральных липидов в альгинатных микроносителях при культивировании в среде, индуцирующей адипогенез, $\times 200$.

Fig. 2. Neutral lipid accumulation in alginate microcarriers during culturing in adipogenesis-inducing medium, $\times 200$.

Under 2D culturing the BM MSCs chondrogenic differentiation is known as not practically realised. During first culturing week of cryopreserved BM MSCs as a part of microcarriers in the medium, inducing chondrogenesis, the formation of cell aggregates of different sizes and shapes was noted (Fig. 1). During following cultivation the aggregate size increased, 28 days later they were positively stained for II type collagen.

Cells in adipogenesis-inducing medium from the third culturing week accumulated in an intracellular space the neutral lipids (Fig. 2), stained with Oil Red O. During culturing the size of vesicles, comprising neutral lipids, increased.

Conclusions

Cultured mesenchymal stromal cells of bone marrow, subjected to a slow freezing, long-term storage in liquid nitrogen and thawing, preserve the capability of chondro- and adipogenic differentiation under 3D culture conditions as a part of alginate microcarriers.

References

1. Petrenko A.Yu., Mazur S.P., Petrenko Yu.A. Isolation and multilinear differentiation of stromal cells from fetal and adult human tissues // *Transplantologiya*.– 2007.– Vol. 19, N1.– P. 218–220.
2. Almeida M., Han L., Martin-Millan M. et al. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor to forkhead box O-mediated transcription // *J. Biol. Chem.*– 2007.– Vol. 282, N37.– P. 27298–27305.
3. Bonab M.M., Alimoghaddam K., Talebian F. et al. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro* // *BMC Cell. Biology*.– 2006.– Vol. 7:14.
4. Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the

ходе культивирования размер везикул, содержащих нейтральные липиды, увеличивался.

Выводы

Культированные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга, подвергнутые медленному замораживанию, длительному хранению в жидком азоте и отогреву, сохраняют способность к хондро- и адипогенной дифференцировке в условиях трехмерной культуры в составе альгинатных микроносителей.

- greatest potential to propagate and differentiate // *Br. J. Haematol.*– 1999.– Vol. 107, N2.– P. 275–281.
5. *Gruber H.E., Hanley E.N.* Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation // *BMC Musculoskelet. Disord.*– 2000.– Vol. 10: 1.
6. *Kim J.B., Stein R., O'Hare M.J.* Three-dimensional *in vitro* tissue culture models of breast cancer – a review // *Breast Cancer Res. Treat.*– 2004.– Vol. 85, N3.– P. 281–291.
7. *Marquette M.L., Byerly D., Sognier M.* The effects of three-dimensional cell culture on single myoblasts // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*– 2008.– Vol. 44, N3-4.– P. 105–114.

Accepted in 13.05.2008

Литература

1. *Петренко А.Ю., Мазур С.П., Петренко Ю.А. и др.* Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // *Трансплантология.* – 2007.– Т. 9, №1.– С. 218–220.
2. *Almeida M., Han L., Martin-Millan M. et al.* Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor to forkhead box O-mediated transcription // *J. Biol. Chem.*– 2007.– Vol. 282, N37.– P. 27298–27305.
3. *Bonab M.M., Alimoghaddam K., Talebian F. et al.* Aging of mesenchymal stem cell *in vitro* // *BMC Cell. Biology.*– 2006.– Vol. 7:14.
4. *Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., et al.* Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate // *Br. J. Haematol.*– 1999.– Vol. 107, N2.– P. 275–281.
5. *Gruber H.E., Hanley E.N.* Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation // *BMC Musculoskelet. Disord.*– 2000.– Vol. 10: 1.
6. *Kim J.B., Stein R., O'Hare M.J.* Three-dimensional *in vitro* tissue culture models of breast cancer – a review // *Breast Cancer Res. Treat.*– 2004.– Vol. 85, N3.– P. 281–291.
7. *Marquette M.L., Byerly D., Sognier M.* The effects of three-dimensional cell culture on single myoblasts // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*– 2008.– Vol. 44, N3-4.– P. 105–114.

Поступила 13.05.2008