

## Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер

А.Ю. ПЕТРЕНКО, Ю.А. ПЕТРЕНКО, В.С. ЗАЙКОВ, А.И. ПРАВДЮК, Н.А. ТРУФАНОВА  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

### Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells Within Alginate Microspheres

A.YU. PETRENKO, YU.A. PETRENKO, V.S. ZAYKOV, A.I. PRAVDYUK, N.A. TRUFANOVA  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Одним из перспективных направлений тканевой инженерии является инкапсуляция клеток в микроносители. Клетки, заключенные в микросферы, при трансплантации не подвергаются атаке иммунной системы организма, что обеспечивает их длительное функционирование. В связи с этим инкапсулированные клетки находят все более широкое применение в регенеративной медицине, что требует разработки подходов для их длительного хранения. Кроме того, клетки в составе микросфер можно рассматривать как специфическую криобиологическую модель ткани, в которой клетки иммобилизованы, но лишены межклеточных контактов. В качестве «клеточной» составляющей тканевой инженерной конструкции высоким регенеративным потенциалом обладают мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), поскольку они способны дифференцироваться в различные типы клеток как *in vitro*, так и *in vivo*.

Цель настоящей работы – изучение особенностей ответа МСК в составе альгинатных микросфер на традиционные методы криоконсервирования и витрификацию.

Инкапсулированные МСК криоконсервировали в криозащитных средах, эффективность которых была продемонстрирована на суспензии МСК. Общепринятое криоконсервирование проводили под защитой диметилсульфоксида (ДМСО) в присутствии сыворотки по разным протоколам замораживания. Витрификацию осуществляли в мультикомпонентной среде ДЭПС-1, содержащей ДМСО, этиленгликоль, 1,2-пропандиол и сахарозу. В обоих случаях образцы криоконсервировали в стандартных криопробирках и хранили в жидком азоте.

При культивировании в составе альгинатных микросфер МСК сохраняли жизнеспособность и метаболическую активность, но прекращали делиться. Ответ клеток, заключенных в микросферы, на общепринятое криоконсервирование был аналогичным клеткам в суспензии. Наиболее высокие уровни жизнеспособности и метаболической активности были получены при использовании медленного ступенчатого охлаждения с инициацией кристаллообразования под защитой 10% ДМСО. Однако для успешной витрификации инкапсулированных клеток условия, обеспечивающие жизнеспособность клеток в суспензии, оказались неприемлемыми из-за более медленного распределения криопротекторов между клетками и средой. Модификация условий эквilibрации позволила добиться уровня жизнеспособности инкапсулированных МСК на уровне клеток в суспензии. МСК, криоконсервированные как общепринятым методом, так и путем витрификации, сохраняли специфический иммунофенотип и способность к мультилинейной дифференцировке, что свидетельствует о перспективности обоих подходов для долгосрочного хранения клеток в составе микросфер.

One of the advanced directions in tissue engineering is encapsulation of cells into microcarriers. The cells, encapsulated into microspheres, do not undergo any attacks from an organism's immune system during transplantation that provides their long-term functioning. In this case the encapsulated cells become more widely used in regenerative medicine, requiring the development of approaches for their long-term storage. In addition, cells within the microspheres may be considered as a specific cryobiological model of tissue, where the cells are immobilized. However, in this case the cell-to-cell contacts are absent. The multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) have a high regenerative potential as a 'cellular' component in tissue-engineering constructs, due to their capacity to differentiate into different cell types both *in vitro* and *in vivo*.

This research was directed to study the peculiarities of MSCs response as a part of alginate microspheres to the conventional cryopreservation methods and vitrification.

The encapsulated MSCs were cryopreserved in cryoprotective media previously described as effective for MSCs suspensions. The standard cryopreservation procedure was carried-out under protection of dimethyl sulfoxide (DMSO) in the presence of serum with the application of different freezing protocols. The vitrification was performed in multicomponent solution DEPS-1, containing DMSO, ethylene glycol, 1,2-propanediol and sucrose. In both cases the samples were cryopreserved in the standard cryovials and stored in liquid nitrogen. During culturing within alginate microspheres MSCs preserved the viability and metabolic activity, however were not able to proliferate. The response of cells encapsulated into microspheres to the standard cryopreservation protocol was similar to those in suspension. The highest levels of viability and metabolic activity were obtained under protection of 10% DMSO with slow stepwise cooling and initiation of ice crystals formation. However, for successful vitrification of encapsulated cells the conditions, providing survival of cells in suspension, appeared to be not acceptable due to slower penetration and distribution of cryoprotectants between cells and medium. The modification of equilibration conditions enabled to achieve the viability of encapsulated MSCs at the same level as for cells in suspension. The MSCs cryopreserved according to both standard method and vitrification, preserved a specific immunophenotype of cells and their ability for a multilineage differentiation, thus testifying to the perspective of both cryopreservation approaches for long-term storage of cells within the alginate microspheres.