

УДК 611.018.2/.6+615.014.41:664.644.7

Ю.А. Петренко^{1*}, А. Катцен-Глоба², И. Мейзер², Р.В. Иванов³,
В.И. Лозинский³, Х. Циммерманн², А.Ю. Петренко¹

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток в широкопористых объемных альгинат-желатиновых носителях[#]

UDC 611.018.2/.6+615.014.41:664.644.7

Y.A. Petrenko^{1*}, A. Katsen-Globa², I. Meiser², R.V. Ivanov³,
V.I. Lozinsky³, H. Zimmermann², A.Y. Petrenko¹

Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells within Wide-Porous Three-Dimensional Alginate-Gelatin Scaffolds[#]

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, криоконсервирование, альгинат-желатиновые носители, тканевая инженерия.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, криоконсервування, альгінат-желатинові носії, тканинна інженерія.

Key words: mesenchymal stromal cells, cryopreservation, alginate-gelatin scaffolds, tissue engineering.

В настоящее время значительное количество исследований посвящено оценке морфофункциональных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) из различных источников при монослойном культивировании *in vitro* [1]. Вместе с тем монослойное культивирование не может полностью имитировать природное окружение клеток *in vivo*. Для достижения объемной организации клеточных элементов вне организма используют трехмерные носители (скаффолды) на основе различных материалов [2]. Ранее нами были проведены исследования, посвященные оценке биосовместимости, а также способности различных типов матриц-носителей обеспечивать адгезию, пролиферацию и направленную дифференцировку МСК при объемном культивировании [4, 5]. Наиболее выраженный результат был получен при использовании широкопористых криогелевых альгинат-желатиновых носителей – в условиях трехмерного культивирования МСК сохраняли способность к пролиферации и мультилинейной дифференцировке [5]. Создание биоэквивалентов ткани является трудоемким и сложным процессом, включающим выделение и экспансию клеток, заселение в объемные носители и последующую диффе-

Nowadays, a large number of investigations is intended to evaluate morphological and functional properties of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from various sources during *in vitro* monolayer culture [1]. However, the monolayer culture can not adequately simulate the conditions the cells experiencing *in vivo*. To realize spatial organization of cells *ex vivo* the three-dimensional carriers (scaffolds) based on various materials are used [2]. We reported previously the evaluations of biocompatibility of different types of carriers and their ability to promote adhesion, proliferation and induced differentiation of MSCs during three-dimensional culture [4, 5]. The most remarkable results were obtained when using the wide-porous cryogel alginate-gelatin carriers: during three-dimensional culture the MSCs retained the ability for proliferation and multilineage differentiation [5]. The formation of tissue bioequivalents is a time-consuming and complex process, which involve the selection and expansion of cells, their seeding into three-dimensional carriers and subsequent differentiation in a given direction. This could be supported by development of effective cryopreservation methods that will allow to preserve morphological and functional characteristics of the cells in three-dimen-

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина

²Отдел биофизики и криотехнологий, Институт биомедицинской инженерии Общества Фраунгофера, г. Санкт-Ингберт, Германия

³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва, Россия

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: yu.a.petrenko@gmail.com

[#]Данное исследование было представлено на минисимпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 24 мая 2013 года в г. Киеве.

Поступила 15.06.2013

Принята в печать 01.12.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 351–354. © 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Department for Biophysics and Cryotechnology, Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering, St. Ingbert, Germany.

³A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

*To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: yu.a.petrenko@gmail.com

[#]This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24th of May, 2013.

Received June, 15, 2013

Accepted December, 1, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 4. – P. 351–354. © 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

ренцировку в заданном направлении. В связи с этим разработка эффективных методов криоконсервирования, позволяющих сохранить морфофункциональные характеристики клеток в составе трехмерных матриц-носителей, является актуальной задачей. Целью настоящей работы было установить возможность криоконсервирования МСК в составе альгинат-желатиновых скаффолдов (АЖС), а также оценить влияние степени расплывания клеток на поверхности носителя на их криоповреждение.

В работе использовали МСК костного мозга (КМ) взрослого человека 3–5 пассажей. Культивирование стромальных клеток проводили в среде α -MEM, дополненной 15% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота, пенициллина (50 ед/мл), стрептомицина (50 мг/мл) и L-глутамина (2 мМ), в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 95%-й влажности.

Альгинат-желатиновые скаффолды в виде дисков толщиной 2 мм и диаметром 10 мм получали согласно методу, описанному ранее [5].

Криоконсервирование трехмерных культур МСК проводили через 0,5 ч (группа 1) после заселения матриц клетками, а также после 2 ч (группа 2) и 24 ч (группа 3) инкубации биоконструкций в описанных выше условиях. Заселенные МСК альгинат-желатиновые матрицы переносили в криоконтейнеры с 0,5 мл криозащитной среды следующего состава: α -MEM, 15% ЭС и 10% диметилсульфоксида (ДМСО). Далее образцы охлаждали со скоростью 1 град/мин до –80°C, после чего погружали в жидкий азот. Размораживание МСК в составе АЖС проводили на водяной бане при 37°C, затем влажные структуры переносили в 24-луночные планшеты, в которых трижды мягко отмывали от криозащитной среды.

Жизнеспособность клеток оценивали по результатам комбинированного окрашивания флуоресцентными красителями флуоресцеин диацетатом (ФДА) и этидиум бромидом (ЭБ). Анализ проводили с помощью конфокального сканирующего микроскопа «LSM 510 Meta» («Carl Zeiss», Германия). Морфологические особенности клеток оценивали с использованием растрового электронного микроскопа «FESEM XL30» («Phillips», Нидерланды).

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента в программе Origin v.4.0. Статистически значимыми считали отличия между парными выборками при $p < 0,05$.

Все эксперименты выполнены с соблюдением принципов биоэтики и норм биологической безопасности.

Проведенный анализ степени расплывания МСК в альгинат-желатиновых носителях показал, что через 0,5 ч после заселения большинство адгезировавших МСК были округлой формы (рис. 1, А). Через 2 ч инкубации некоторые МСК были распластаны на

sional carriers. In this regard, the aim of this work was to evaluate the possibility of cryopreservation of MSCs within alginate-gelatin scaffolds (AGSs), as well as to assess how the extent of cell spreading on the carrier's surfaces affects their cryodamage.

Human adult bone marrow (BM) mesenchymal stromal cells from 3rd–5th passages were used in the study. Culture of MSCs was performed in α -MEM, supplemented with 15% fetal calf serum (FCS), Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 mg/ml) and L-glutamine (2 mM) in an incubator at 37°C/5% CO₂ and 95% humidity.

Alginate-gelatin scaffolds were the 2 mm thick disks with a diameter of 10 mm prepared according to our method reported previously [5].

Cryopreservation of three-dimensional cultures of MSCs was performed 0.5 hr (group 1) after cells seeding into matrices, as well as 2 hrs (group 2) and 24 hrs (group 3) post seeding and incubation of bioconstructs in above described conditions. Alginate-gelatin carriers populated with MSCs were transferred to cryovials filled with 0.5 ml of cryoprotective medium: α -MEM, 15% FCS and 10% dimethyl sulfoxide (Me₂SO). Thereafter the samples were cooled with 1 deg/min rate down to –80°C and then plunged into liquid nitrogen. Thawing of MSCs within AGSs was performed in a water bath at 37°C, the wet structures were then transferred to 24-well plates and three times gently washed free of cryoprotective medium.

Cell viability was assessed by combined staining with fluorescent dyes fluorescein diacetate (FDA) and ethidium bromide (EB). Analysis was carried out using a confocal laser scanning microscope LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Germany). Morphological characteristics of cells were evaluated using scanning electron microscope FESEM XL30 (Phillips, Netherlands).

The results obtained were statistically processed using Student t-test and Origin v. 4.0 software. Differences between paired samples were considered as significant at $p < 0.05$.

All the experiments were conducted in compliance with the bioethical principles and biosafety regulations.

The performed analysis of spreading extent observed in MSCs during culture in alginate-gelatin carriers showed that 0.5 hr post seeding the majority of adhered MSCs had a rounded shape (Fig. 1A). After 2 hr incubation, some MSCs were flattened on the substrate surface; however, rounded cells were also observed (Fig. 1B). After 24 hrs of culturing, almost all MSCs within AGSs were flattened and had fibroblast-like morphology (Fig. 1B).

Analysis of FDA/EB double staining MSCs within AGSs revealed a high viability of the cells prior to cryopreservation (Fig. 2A, B, and C): more than 95% cells had the cytoplasm stained with FDA and nuclei



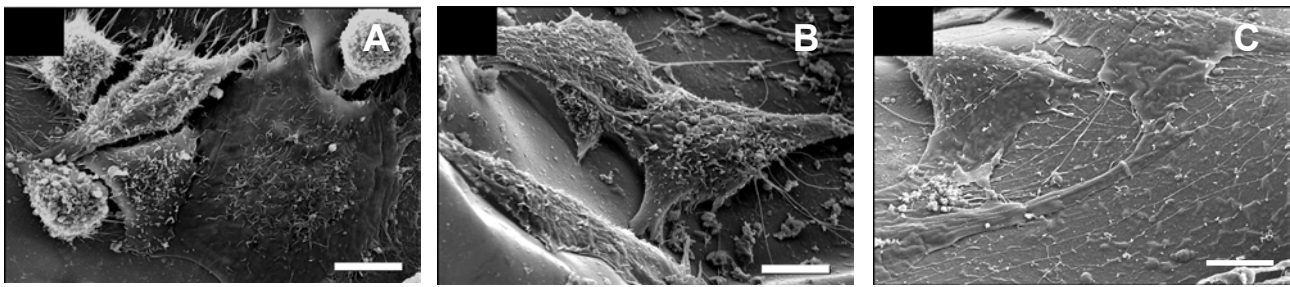


Рис. 1. Мезенхимальные стромальные клетки культивируемые на поверхности широкопористых альгинат-желатиновых носителей: **A** – через 0,5 ч; **B** – 2 ч; **C** – 24 ч после заселения; растровая электронная микроскопия; масштабный отрезок 10 мкм.

Fig. 1. Mesenchymal stromal cells cultured on the surfaces of wide-porous alginate-gelatin carriers: **A** – 0.5 hr; **B** – 2 hrs; and **C** – 24 hrs post seeding; raster electron microscopy; bar 10 μ m.

поверхности субстрата, однако наблюдались и округлые клетки (рис. 1, B). Через 24 ч культивирования практически все МСК в составе АЖС были распластаны и обладали фибробластоподобной морфологией (рис. 1, C).

Анализ двойного окрашивания ФДА/ЭБ МСК в составе АЖС показал высокую жизнеспособность клеток до криоконсервирования (рис. 2, A, B, C): более чем у 95% клеток цитоплазма была окрашена ФДА, а ядра не имели окрашивания ЭБ (ФДА⁺/ЭБ⁻). Значимых отличий между группами не отмечено.

Криоконсервирование приводило к значимому снижению жизнеспособности клеток в составе трехмерных конструкций (рис. 2, D, E, F). Причем в разных группах величина снижения данного показателя была неодинаковой. В экспериментальных группах 1 и 2 количество жизнеспособных клеток (ФДА⁺/ЭБ⁻) после криоконсервирования составляло (81 ± 3)% и (81 ± 5)% соответственно. Замораживание-отогрев АЖС через 24 ч после заселения клетками (группа 3) приводило к более выраженному снижению жизнеспособности МСК до (66 ± 5)%.

Ранее было показано [3], что жизнеспособность деконсервированных клеток после 24 ч рекультивирования может значительно отличаться от показателей, полученных непосредственно после отогрева. В связи с этим для более корректной оценки эффективности криоконсервирования МСК в составе трехмерных АЖС, проводили анализ жизнеспособности клеток после рекуль-

тивирования (ФДА⁺/ЭБ⁻). No significant differences between the groups were found.

Cryopreservation resulted in a significant fall in viability of the cells within three-dimensional constructs (Fig. 2D, E, and F). Moreover the decrease of this parameter was unequal among the groups. In the groups 1 and 2 the number of viable cells (ФДА⁺/ЭБ⁻) was (81 ± 3)% and (81 ± 5)%, respectively. Freeze-thawing of AGSs 24 hrs post cell seeding (group 3) resulted in a greater reduction in the viability of MSCs down to (66 ± 5)%.

It was shown previously [3] that the viability of thawed cells following 24 hrs re-culturing might differ significantly from the values, assessed immediately after

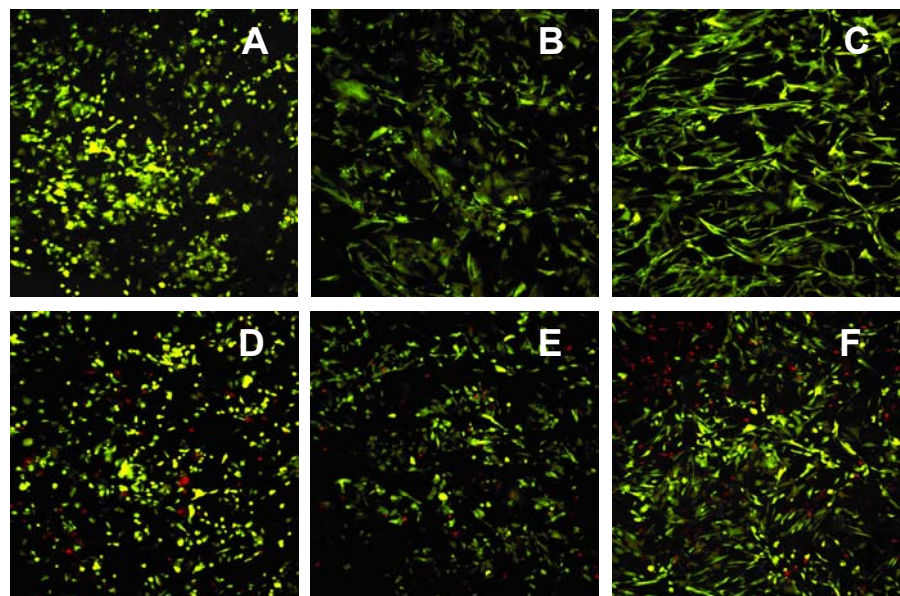


Рис. 2. Жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинат-желатиновых носителей до (**A, B, C**) и после (**D, E, F**) криоконсервирования: **A, D** – группа 1 (0,5 ч после заселения); **B, E** – группа 2 (2 ч после заселения); **C, F** – группа 3 (24 ч после заселения); лазерная конфокальная микроскопия; окрашивание ФДА (зеленый)/ЭБ (красный); совмещение конфокальных изображений вдоль оси z (высота 100 мкм)

Fig. 2. Viability of mesenchymal stromal cells within alginate-gelatin carriers prior to (**A, B, C**) and after (**D, E, F**) cryopreservation: **A, D** – group 1 (0.5 hr post seeding); **B, E** – group 2 (2 hrs post seeding); **C, F** – group 3 (24 hrs post seeding); confocal laser scanning microscopy; double staining with FDA (green fluorescence)/EB (red fluorescence); merged stack of confocal images along z axis (100 μ m).

тивирования деконсервированных образцов. После 24 ч рекультивирования наблюдалось увеличение количества ЭБ⁺-клеток в группах 1 и 2: жизнеспособность МСК составляла $(75 \pm 3)\%$ и $(77 \pm 3)\%$ соответственно; а в группе 3 не изменялась и составляла $(66 \pm 4)\%$. После 48 ч рекультивирования большинство МСК в составе широкопористых АЖС всех экспериментальных групп обладали фибробластоподобной морфологией. Жизнеспособность клеток после 48 ч рекультивирования составляла (88 ± 6) , (93 ± 3) и $(91 \pm 3)\%$ в группах 1, 2 и 3 соответственно.

Таким образом, наше исследование показало возможность криоконсервирования МСК в составе объемных альгинат-желатиновых носителей. При этом отмечено влияние степени распластывания клеток на поверхности субстрата на их криоустойчивость. Последующее рекультивирование деконсервированных МСК в составе объемных структур привело к увеличению показателя жизнеспособности во всех группах. В целом полученные данные могут послужить основой для разработки эффективных методов криоконсервирования объемных биоинженерных конструкций, содержащих МСК, и последующего создания низкотемпературных банков биоинженерных конструкций для регенеративной медицины и тканевой инженерии.

thawing. In this regard, to evaluate more correctly the outcomes of MSCs cryopreservation within the three-dimensional AGSs we performed the analysis of cell viability following re-culturing of thawed samples. After 24 hrs re-culturing the increase of EB⁺ cells number in the group 1 (0.5 hr) and the group 2 (2 hrs) was observed: viability of MSCs comprised $(75 \pm 3)\%$ and $(77 \pm 3)\%$, respectively. The viability of MSCs in group 3 did not change during re-culturing and comprised $(66 \pm 4)\%$. After 48 hours of re-culturing the most MSCs within wide-porous AGSs in all experimental groups were of fibroblast-like morphology. The viability of MSCs after 48 hrs of re-culturing was (88 ± 6) , (93 ± 3) and $(91 \pm 3)\%$, respectively.

Collectively, our study showed the possibility to cryopreserve MSCs within three-dimensional alginate-gelatin carriers. The extent of cell spreading on the substrate surface was shown to affect their cryostability. Following re-culturing of thawed MSCs within three-dimensional structures resulted in an increase of the viability index. Overall, these data can serve as a basis for the development of effective cryopreservation methods intended for MSCs-comprising three-dimensional bioengineered structures and the creation of low-temperature banks of bioconstructs for regenerative medicine and tissue engineering.

Литература

1. Keating A. Perspective mesenchymal stromal cells: new directions // *Stem Cells*. – 2012. – Vol. 10, №6. – P. 709–716.
2. Langer R., Vacanti P., Freed L.E., Vunjak-Novakovic G. Tissue engineering?: biomedical applications // *Tissue Engineering*. – 1995. – Vol. 1, N2. – P. 151–161.
3. Malpique R., Ehrhart F., Katsen-Globa A. et al. Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing // *Tissue Engineering. Part C*. – 2009. – Vol. 15, №3. – P. 373–86.
4. Petrenko Y.A., Petrenko A.Y., Damshkaln L. et al. Growth and adipogenic differentiation of mesenchymal stromal bone marrow cells during culturing in 3D macroporous agarose cryogel sponges // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 146, №1. – P. 129–132.
5. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Y., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2011. – Vol. 22, №6. – P. 1529–1540.

References

1. Keating A. Perspective mesenchymal stromal cells: new directions // *Stem Cells*. – 2012. – Vol. 10, №6. – P. 709–716.
2. Langer R. Vacanti P., Freed L.E., Vunjak-Novakovic G. Tissue engineering?: biomedical applications // *Tissue Engineering*. – 1995. – Vol. 1, N2. – P. 151–161.
3. Malpique R., Ehrhart F., Katsen-Globa A. et al. Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing // *Tissue Engineering. Part C*. – 2009. – Vol. 15, N3. – P. 373–86.
4. Petrenko Y.A., Petrenko A.Y., Damshkaln L. et al. Growth and adipogenic differentiation of mesenchymal stromal bone marrow cells during culturing in 3D macroporous agarose cryogel sponges // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 146, N1. – P. 129–132.
5. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Y., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2011. – Vol. 22, N6. – P. 1529–1540.

