

# Сохранение дифференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер после криоконсервирования

А.И. ПРАВДЮК

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

## Preservation of Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated in Alginate Microbeads After Freeze-Thawing

A.I. PRAVDYUK

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

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают уникальной способностью к мультилинейной дифференцировке, что позволяет использовать их в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Инкапсуляция МСК в альгинатные микросферы (АМС) является одним из перспективных подходов тканевой инженерии. Механизмы и степень криоповреждений клеток в суспензиях и составе АМС могут отличаться. Поэтому влияние криоконсервирования на сохранение функциональных параметров клеток в составе альгинатного гидрогеля требует детального изучения.

Цель работы – исследование дифференцировочного потенциала МСК после криоконсервирования в составе АМС.

Инкапсуляцию проводили путем распыления раствора альгината натрия с МСК в раствор, содержащий ионы кальция. Жизнеспособность инкапсулированных клеток определяли по комбинированному окрашиванию флуоресцентными красителями при помощи конфокальной микроскопии. Для оценки метаболической активности МСК применяли Alamar Blue-тест. Дифференцировку деконсервированных МСК в составе АМС проводили путем их культивирования в средах, содержащих соответствующие индуцирующие факторы. Продукты дифференцировки определяли биохимическими и гистологическими методами.

В экспериментах на МСК, выделенных из мезодермально-мезенхимальных тканей плодов человека, было установлено, что быстрое замораживание приводит к изменению оптических свойств альгинатного гидрогеля и критическому снижению жизнеспособности инкапсулированных клеток, тогда как медленное замораживание позволяет в значительной степени сохранить жизнеспособность клеток в составе АМС. Максимальные значения сохранности и метаболической активности клеток в АМС были получены при медленном программном замораживании с использованием инициации кристаллизации в присутствии 10% ДМСО. В связи с этим данный протокол применяли при криоконсервировании АМС с МСК, выделенными из костного мозга взрослого человека, которые в составе АМС демонстрировали высокую жизнеспособность после деконсервирования и сохраняли ее в течение периода культивирования. Они, как и клетки, не подвергавшиеся замораживанию, были способны к направленной дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях.

Таким образом, медленное программное замораживание с инициацией кристаллизации позволяет обеспечить высокую сохранность инкапсулированных в АМС мезенхимальных стромальных клеток и сохранить их дифференцировочный потенциал.

Mesenchymal stromal cells (MSCs) possess an unique ability to multi-lineage differentiation allowing their use in regenerative medicine and tissue engineering. Encapsulation of MSCs into alginate microbeads (AMBs) is one of perspective approaches of tissue engineering. Mechanisms and extent of cryodamages of cells in suspensions and inside the AMBs may differ. Therefore the cryopreservation effect on functional parameters of cells inside the alginate hydrogel demands a detailed study.

The research aim was to investigate the differentiation potential of MSCs after cryopreservation inside the AMBs.

Encapsulation was performed by means of spraying the sodium alginate solution containing MSCs into the solution with calcium ions. Viability of encapsulated cells was assessed by combined staining with fluorescent dyes and confocal microscopy. To assess metabolic activity of MSCs the Alamar Blue test was used. Differentiation of frozen-thawed MSCs inside the AMBs was performed by means of their culturing in the media containing corresponding inducing factors. The products of differentiation were examined with biochemical and histological methods.

The experiments in MSCs, derived from mesodermal mesenchymal tissues of human fetuses, showed that rapid freezing resulted in the change of optic properties of alginate hydrogel and critical reduction of viability of encapsulated cells. Meanwhile slow freezing allowed the significant preservation of viability of AMB encapsulated cells. Maximum values of survival and metabolic activity of cells in AMBs were obtained after controlled rate slow freezing with ice nucleation in presence of 10% DMSO. In this connection this protocol was applied to cryopreserve the AMBs with MSCs, isolated from adult bone marrow. These cells showed a high post-thaw viability and preserved it during culturing. Like non-frozen cells they were able for directed differentiation into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages.

Thus controlled rate slow freezing with ice nucleation enables high post-thaw integrity of MSCs encapsulated in AMBs as well as their differentiation potential preservation.