

Систематическая оптимизация параметров при разработке протоколов криоконсервирования суспензий мезенхимальных стволовых клеток

Д. ПОГОЖИХ^{1,2}, Н. ХОФМАНН¹, Т. МЮЛЛЕР³, Б. ГЛАСМАХЕР¹

¹Ганноверский Университет им. Лейбница, Институт мультифазных процессов, Ганновер

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

³Медицинская Школа Ганновера, Институт Трансфузионной Медицины, Ганновер

Development of Optimal Cryopreservation Protocol for Suspensions of Mesenchymal Stem Cells with Application of Systematic Parameter Optimization

D. POGOZHUKH^{1,2}, N. HOFMANN¹, T. MUELLER³, B. GLASMACHER¹

¹Leibniz Universitaet Hannover, Institute for Multiphase Processes, Hannover, Germany

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

³Hannover Medical School, Institute for Transfusion Medicine, Hannover, Germany

На сегодняшний день криоконсервирование является единственным доступным способом долгосрочного хранения биологических объектов. Существует ряд особенностей, связанных с фазовым переходом воды в лед и наоборот. Клетки различных типов по-разному реагируют на воздействие низких температур, что приводит к необходимости точного и тщательного подбора протоколов замораживания для каждого типа. Изучение стволовых клеток – одно из наиболее перспективных направлений в области биологии и регенеративной медицины. Успешное криоконсервирование суспензий стволовых клеток позволит повысить эффективность их применения.

Для успешного криоконсервирования клеточных суспензий, позволяющего обеспечить высокую выживаемость клеток, а также потенциал к рекультивации, необходимо оптимизировать параметры охлаждения и оттаивания. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обезьян-игрунок (*Callithrix jacchus*) использовали в качестве клеточной модели для подбора оптимальных параметров замораживания, модифицируя скорости охлаждения и концентрацию криопротектора (КП). В исследование были включены 48 двухступенчатых протоколов с разными скоростями охлаждения (В) в диапазоне от 1 до 10 К/мин (В1 в диапазоне от 4 до –30°C и В2 от –30 до –80°C). Все протоколы изучали при четырех различных концентрациях наиболее часто применяемого криопротектора ДМСО. Для систематического сочетания этих параметров была применена растровая схема равномерного распределения. Для контроля скоростей охлаждения использовали устройство «Micrometer-freezer», разработанный в Институте мультифазных процессов (Ганновер, Германия). Прибор позволяет проводить параллельное измерение в 96 пробах при 12 различных скоростях охлаждения. Для оценки жизнеспособности клеток применяли автоматический счетчик со встроенным окрашиванием TrypanBlue®. После оттаивания выжившие клетки тестировали на способность к пролиферации и дифференцировке. Для получения эффективных параметров замораживания была разработана система оптимизации влияющих факторов (скорость замораживания, концентрация КП). С помощью такого подхода был подобран оптимальный протокол для криоконсервирования МСК. В предыдущих исследованиях данный подход также использовали для улучшения протоколов криоконсервирования линии клеток легочного эндотелия человека ST1.6R и первичных кератиноцитов человека. Для этих клеточных моделей дополнительно изучали характеристики и перспективы применения альтернативных КП (эктоина и пролина). Наилучшие результаты были достигнуты при применении протоколов: 5 К/мин (В1) в сочетании с 7,5 К/мин (В2); 5 К/мин в сочетании с 10 К/мин; 7,5 К/мин в сочетании с 10 К/мин. Оптимальные концентрации ДМСО составляли 7,5 и 10%.

Исследования проводились при поддержке Немецкого научно-исследовательского общества для кластера передового опыта REBIRTH (EXC 62/1).

Cryopreservation is the only available method today for the long-term storage of biological objects. However, there are many difficulties and peculiarities connected with the phase transitions of water into ice and vice versa. Cells of different types respond to the impact of low temperatures in a different manner, which requires precise freezing protocols for each type. Today, stem cell research is one of the most promising areas in biology and regenerative medicine. Successful cryopreservation of suspensions of stem cells would allow increasing effectiveness of their application. Effective cryopreservation of cellular suspensions requires optimization of cooling and thawing parameters in order to guarantee high survival rate and potential for reculturing.

Mesenchymal stem cells (MSCs) of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) were used as a cell model and optimal freezing parameters were developed by means of controlling freezing rates and concentration of cryoprotective agent (CPA). The investigation included 48 protocols with different cooling rates (B) in the range of 1 K/min to 10 K/min in two-step freezing protocols (B1 in the range of 4°C to –30°C and B2 from –30°C to –80°C). All protocols have been studied with four different concentrations of the most frequently applied CPA, DMSO. An evenly distributed measuring raster was applied for systematic combination of these parameters. For controlled freezing rates, we used a micrometer-freezer device, developed at the Institute for Multiphase Processes at LUH (Hannover, Germany). It allows parallel measurement of 96 samples with 12 various cooling rates. For the evaluation of the cellular viability an automatic cell counter with integrated TrypanBlue® staining was applied. After thawing, survived cells were tested for proliferation and differentiation.

In order to optimize freezing parameters, we have developed a systematic factor-optimization system. With the application of such an approach, we have found optimal cryopreservation protocol for MSCs. In previous investigations this setup was also used to improve the cryopreservation protocols for human pulmonary microvascular endothelial cells-ST1.6R and primary human keratinocytes. For these cellular models, application perspectives and characteristics of alternative CPAs (ectoine and proline) were additionally investigated. The best results were achieved with the application of protocols: 5 K/min (B1) combined with 7.5 K/min (B2); 5 K/min combined with 10 K/min; and 7.5 K/min combined with 10 K/min. Concentrations of DMSO were 7.5 and 10%.

This work is supported by funding from the German Research Foundation for the Cluster of Excellence REBIRTH (EXC 62/1).