

УДК 611.018.2/6.086.13:664.644.7:57.043

В.С. Зайков\*, Ю.А. Петренко, Н.А. Труфанова,  
А.И. Правдюк, Н.А. Волкова, С.П. Мазур, А.Ю. Петренко

## Влияние криоконсервирования путем медленного замораживания или витрификации на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток, заключенных в альгинатные сферы с диаметром более 1 мм

UDC 611.018.2/6.086.13:664.644.7:57.043

V.S. Zaikov\*, Yu.A. Petrenko, N.A. Trufanova,  
A.I. Pravdyuk, N.A. Volkova, S.P. Mazur, A.Yu. Petrenko

## Effect of Cryopreservation Using Slow Freezing or Vitrification on Viability and Metabolic Activity of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated Within Alginate Spheres with Diameter of 1 mm and More

**Реферат:** В работе изучено влияние времени экспозиции мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в составе альгинатных микросфер с применением криозащитной среды ДЭПС-1, состоящей из 10% диметилсульфоксида, 20% этиленгликоля, 20% 1,2-пропандиола и 0,5 М сахарозы, на их сохранность и метаболическую активность после криоконсервирования методом витрификации. В работе были использованы сферы с диаметром более 1 мм, полученные путем покапельного внесения альгината натрия в раствор хлорида кальция. Альгинатные сферы, полученные с помощью такого метода несли большее количество клеточного материала по сравнению со сферами с диаметром (0,5 ± 0,2) мм, полученными путем распыления альгината в раствор хлорида кальция. Показано, что использование криозащитной среды ДЭПС-1 позволяет проводить успешное криоконсервирование МСК, инкапсулированных в альгинатные сферы с разным диаметром. Установлено, что для насыщения инкапсулированных МСК с диаметром 1,2 мм криозащитным раствором необходима более продолжительная экспозиция клеток в растворе по сравнению с МСК, инкапсулированными в сферы с диаметром 0,5 мм.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стромальные клетки, альгинатные сферы, витрификация, мультикомпонентный раствор криопротекторов, ступенчатое насыщение клеток криозащитным раствором.

**Реферат:** Досліджено вплив часу експозиції мезенхімальних стромальних клітин (МСК) у складі альгінатних мікросфер із застосуванням криозахисного середовища ДЕПС-1, що складається з 10% диметилсульфоксиду, 20% етиленгліколю, 20% 1,2-пропандіолу і 0,5 М сахарози, на їх збереженість і метаболічну активність після криоконсервування шляхом вітрифікації. У роботі були використані сфери з діаметром більше 1 мм, отримані шляхом покапельного внесення альгінату натрію у розчин хлориду кальцію. Альгінатні сфери, отримані за допомогою такого методу, несли більшу кількість клітинного матеріалу порівняно зі сферами з діаметром (0,5 ± 0,2) мм, отриманими шляхом розпилення альгінату в розчин хлориду кальцію. Показано, що використання криозахисного середовища ДЕПС-1 дозволяє проводити успішне криоконсервування МСК, інкапсульованих в альгінатні сфери, з різним діаметром. Встановлено, що для насичення криозахисним розчином інкапсульованих МСК із діаметром 1,2 мм необхідна триваліша експозиція клітин у розчині порівняно з МСК, інкапсульованими у сфери з діаметром 0,5 мм.

**Ключові слова:** мезенхімальні стромальні клітини, альгінатні мікросфери, вітрифікація, мультикомпонентний розчин криопротекторів, ступінчасте насичення клітин криозахисним розчином.

**Abstract:** The aim of the study was to evaluate the effect of exposure duration of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells (MSCs) in multicomponent cryoprotective solution DEPS-1 (10% dimethyl sulfoxide, 20% ethylene glycol, 1,2-propane diol and 0.5 M sucrose) on survival and metabolic activity following cryopreservation using vitrification. The spheres of 1mm diameter obtained by dropwise addition of sodium alginate into calcium chloride were used in the experiments. Alginate spheres derived by this method contained more cells as compared to the spheres of (0.5 ± 0.2) mm derived by pulverizing the alginate into calcium chloride. It was shown that using of multicomponent cryoprotective solution DEPS-1 allowed achieving successful cryopreservation of MSCs encapsulated in alginate spheres of different sizes. It was found that saturation with cryoprotective solution of MSCs encapsulated in spheres with 1.2 mm size needed a longer exposure with CPA if compared with spheres of 0.6 mm size.

**Key words:** mesenchymal stromal cells, alginate microspheres, vitrification, multicomponent cryoprotective solution, stepwise exposure.

Отдел криобиохимии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\*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: vedenii.zaikov@gmail.com

Поступила 11.02.2014  
Принята в печать 02.04.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №3. – С. 222–230.  
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 3733034, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: vedenii.zaikov@gmail.com

Received February, 11, 2014  
Accepted April, 02, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(3): 222–230.  
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Инкапсуляция клеток в альгинатные сферы как биотехнологический прием широко используется в тканевой инженерии и клеточной терапии [5, 8]. Такая процедура, с одной стороны, обеспечивает надежные иммобилизацию и иммуноизоляцию при трансплантации, а с другой – сохраняет возможность обмена низкомолекулярными веществами между клетками и внешней средой. Перспективной клеточной составляющей в технологии инкапсуляции являются мезенхимальные стромальные клетки (МСК) человека. Уникальные свойства МСК (высокая пролиферативная активность, мультилинейный дифференцировочный потенциал и низкая иммуногенность) делают их привлекательным объектом для фундаментальных и прикладных областей биологии и медицины [6]. Это, в свою очередь, обуславливает актуальность разработки новых и усовершенствования существующих методов создания низкотемпературных банков инкапсулированных МСК (иМСК).

Ранее нами изучалась возможность сохранения специфических свойств МСК при консервировании их в составе альгинатных сфер с привлечением медленного замораживания под защитой 10% диметилсульфоксида (ДМСО), что позволило значительно сохранить жизнеспособность и метаболическую активность инкапсулированных клеток [7]. Также была осуществлена успешная модификация метода витрификации суспензии МСК с использованием смеси криопротекторов ДЭПС-1 (10% ДМСО, 20% этиленгликоля (ЭГ), 20% 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и 0,5 М сахарозы) для иМСК в составе альгинатных сфер диаметром ( $0,5 \pm 0,2$ ) мм [1]. Преимуществом такого «малого» диаметра является удобство проведения манипуляций со сферами (в том числе в перспективе введения в организм реципиента с помощью стандартных инъекционных игл). Однако метод получения «малых» сфер, основанный на распылении альгината в раствор хлорида кальция, не позволял добиться высокой концентрации инкапсулированных клеток вследствие нестабильной вязкости раствора. Разработка другого методического подхода, заключающегося в капельном внесении альгината в раствор хлорида кальция, дала возможность частично преодолеть эти ограничения и значительно увеличить концентрацию клеток в сферах. Альгинатные сферы, полученные с помощью второго метода, имели больший диаметр. Поскольку размер и форма образцов – значимые в криобиологических исследованиях параметры, возникает вопрос: будут ли условия криоконсервирования МСК в составе сфер «малого» диаметра обеспечивать сохранение их

Encapsulation of cells into alginate spheres is widely used as a biotechnological method in tissue engineering and cell therapy [2, 8]. This procedure, on the one hand, provides reliable immobilization and immune isolation during transplantation, and on another it preserves the ability to provide low molecular weight substances exchange between cells and their environment. Human mesenchymal stromal cells (MSCs) are promising cell component for the encapsulation technique. The unique properties of MSCs (high proliferative activity, multilinear differentiation potential and low immunogenicity) make them an attractive object for fundamental and applied fields of biology and medicine [3]. This, in turn, stipulates the demand of developing new and improving existing methods to create (establish) low-temperature banks of encapsulated MSCs (eMSCs).

Previously we studied the possibility to maintain specific properties of MSCs during their low temperature storage within the alginate spheres using slow freezing and protection by 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), which resulted in significant preservation of the viability and metabolic activity of the encapsulated cells [6]. Moreover we performed a successful modification of MSC suspension vitrification technique using a mixture of cryoprotectants DEPS-1 (10% DMSO, 20% ethylene glycol (EG), 20% 1,2-propanediol (1,2-PD) and 0.5 mol sucrose) for eMSCs within the alginate spheres of ( $0.5 \pm 0.2$ ) mm diameter [7]. The advantage of 'small' diameter is the convenience for performing manipulations with the spheres (including the introduction to the recipient organism using standard injection needles). However, the method of obtaining 'small' spheres based on the spraying of alginate into calcium chloride solution, did not allow to achieve a high concentration of the encapsulated cells due to unstable solution viscosity. Development of other methodological approach involving dropwise addition of alginate to the solution of calcium chloride gave the opportunity to partially overcome these limitations and to significantly increase cell concentration in the spheres. Alginate spheres obtained by the second method had larger diameter. Since the size and shape of the samples are essential parameters in cryobiological research, there arises a question whether the conditions for cryopreservation of MSCs within the spheres of 'small' diameter would provide the preservation of their biological properties within the alginate spheres with larger diameter.

Herewith, the aim of this study was to assess the viability and metabolic state of MSCs within the alginate spheres of different diameters after cryopreservation using slow freezing and vitrification.

биологических свойств в составе альгинатных сфер, имеющих больший диаметр.

В связи с вышеизложенным целью данной работы было оценить жизнеспособность и метаболическое состояние МСК в составе альгинатных сфер разного диаметра после криоконсервирования путем медленного замораживания и витрификации.

### Материалы и методы

В экспериментах использовали МСК дермы человека, полученные от взрослых доноров с их информированного согласия. Клетки получали методом explantation кусочков [2]. Далее их культивировали в среде  $\alpha$ -MEM («Sigma», США), дополненной 10% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота («Биолот, Россия»), 2 mM L-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. При достижении 60–70% конfluence в монослое, МСК 2–3-го пассажа трипсинизировали по стандартной методике и осаждали с помощью центрифугирования при 200g в течение 7 мин. Полученный осадок ресуспендировали в очищенном растворе 1,2% альгината натрия («Sigma») на основе фосфатного буферного раствора (ФБР; «Sigma»). Суспензию клеток в растворе альгината натрия распыляли с помощью специально сконструированного устройства [3] либо вносили по капле с помощью инъекционной иглы (диаметром 0,8 мм) в раствор 100 mM CaCl<sub>2</sub>. После полимеризации (в течение 10 мин) сферы промывали ФБР, дополненным 25 mM HEPES («Sigma»), для удаления избытка CaCl<sub>2</sub>. При распылении диаметр этих сфер составлял (0,5 ± 0,2) мм (группа иМСК-0,5), а после по капле внесения – (1,2 ± 0,1) мм (группа иМСК-1,2). Полученные сферы на сутки помещали в условия культивирования, описанные выше.

Медленное замораживание иМСК-1,2 с контролируемыми скоростями охлаждения проводили под защитой 10%-го ДМСО в среде  $\alpha$ -MEM («Sigma»), содержащей 20% ЭС. Для этого сферы переносили в криоконтейнеры («Nunc», США) объемом 2 мл (из расчета 6 сфер на одну криопробирку), содержавшие 500 мкл криозащитного раствора, и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Образцы охлаждали со скоростью 1 град/мин до –80°C с использованием программного замораживателя «ЗП-10» (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины), после чего переносили в жидкий азот и хранили от 1 до 5 суток. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 37°C, отмывали путем по капле внесения 5 мл среды  $\alpha$ -MEM в течение 10 мин со сменой раствора.

Для проведения экспериментов по витрификации в аналогичные вышеуказанным криоконтейнеры

### Materials and methods

The experiments were performed in human dermal MSCs derived from adult donors after their informed consent. The cells were obtained by explantation of fragments [4]. These were cultured in  $\alpha$ -MEM (Sigma, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biolog, Russia), 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. Following reaching 60–70% confluent monolayer the MSCs of passages 2–3 were trypsinized by standard technique and sedimented by centrifugation at 200g for 7 min. The resulting pellet was resuspended in purified solution of 1.2% sodium alginate (Sigma) based on the phosphate buffered saline (PBS; Sigma). The cell suspension in sodium alginate solution was sprayed with specially designed device [5] or was dropped with an injection needle (0.8 mm diameter) into the solution of 100 mM CaCl<sub>2</sub>. After polymerization (during 10 min) the spheres were washed by PBS supplemented with 25 mM HEPES (Sigma) to remove the excess of CaCl<sub>2</sub>. In case of spraying the diameter of the spheres was (0.5 ± 0.2) mm (group of eMSCs-0.5) and in case of dropping it made (1.2 ± 0.1) mm (group of eMSCs-1.2). The resulting spheres were placed for 24 hrs in culture conditions described above.

Slow freezing of eMSCs-1.2 with the controlled cooling rates was performed under protection of 10% DMSO in  $\alpha$ -MEM (Sigma), containing 20% FBS. For this purpose, the spheres were transferred to 2 ml cryocontainers (Nunc, USA) (6 spheres per cryovial) containing 500  $\mu$ l of cryoprotective solution and incubated for 15 min at room temperature. The samples were cooled at 1 deg/min down to –80°C using the programmable freezer ZP-10 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Ukraine), then transferred into liquid nitrogen and stored from 1 to 5 days. The samples were warmed in water bath at 37°C, washed by dropwise addition of 5 ml  $\alpha$ -MEM during 10 min solution changing.

The experiments on vitrification were performed in equal cryocontainers: 6 eMSC-1.2 spheres were placed to 100  $\mu$ l FBS supplemented with 25 mmol HEPES (Sigma). Then, cryoprotective solution DEPS-1 [7] was poured to the containers and the spheres were incubated at room temperature by one or two stages. To perform one-step exposure the solution with spheres was mixed with 900  $\mu$ l DEPS-1 and incubated for 5 min, in case of two steps the cryocontainer with spheres was filled with 100  $\mu$ l DEPS-1 (the first stage) and then with 800  $\mu$ l of the same cryoprotectant solution (the second stage). After introducing DEPS-1 at the first stage the exposure time was 2 min 30 sec [7] or 4 min



помещали по 6 сфер иМСК-1,2 в 100 мкл ФБР, дополненного 25 мМ НЕРЕС («Sigma»). Далее в контейнеры вносили криозащитный раствор ДЭПС-1 [1] и проводили инкубирование сфер при комнатной температуре в один или два этапа. При одноэтапной экспозиции к раствору со сферами добавляли 900 мкл ДЭПС-1 и выдерживали 5 мин, при двухэтапной вначале в криоконтейнер со сферами вносили 100 мкл ДЭПС-1 (первый этап), а затем добавляли еще 800 мкл того же раствора криопротекторов (второй этап). После внесения ДЭПС-1 на первом этапе время экспозиции составляла 2 мин 30 с [1] или 4 мин 30 с, на втором – 30 с. После экспозиции криоконтейнеры погружали в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане при температуре 37°C, содержимое криоконтейнеров немедленно переносили в 5 мл раствора 0,5 М сахарозы на основе ФБР и в течение 5 мин поэтапно вводили 5 мл среды  $\alpha$ -MEM («Sigma»).

Для оценки влияния экспозиции на жизнеспособность суспензии МСК в пробирки, содержащие клетки в 100 мкл физиологического буфера, вносили 400 мкл раствора криопротекторов, содержащего 10% ДМСО, 20–60% ЭГ, 0–20% 1,2-ПД и 0,5 М сахарозы (в конечной концентрации). Время экспозиции составляло 5 мин, после чего клетки отмывали.

Деконсервированные сферы с МСК культивировали в течение суток в условиях, описанных выше. На одну сферу с МСК приходилось не менее 100 мкл среды культивирования.

Метаболическую активность иМСК оценивали по степени восстановления редокс-индикатора Alamar Blue™ (AB; «Serotec», США) на одних и тех же сферах до криоконсервирования, непосредственно после отогрева и через сутки культивирования после отогрева. Для этого в лунки культурального планшета со сферами добавляли 100 мкл 5%-го раствора АВ. Флуоресценцию восстановленной формы АВ определяли через 2 ч культивирования на спектрофлуориметре («Tecan GENios», Австралия) при длине волны возбуждения 550 нм и волны эмиссии 590 нм. Обработку данных проводили с помощью программы «XFLUOR4 v.4.50» («Tecan GENios»). Результаты представляли как различия между значением флуоресценции опытной и холостой пробы (5%-й раствор АВ) и выражали в условных единицах флуоресценции (УЕФ). Для оценки метаболической активности иМСК-0,5 и иМСК-1,2 использовали одинаковое количество инкапсулированного клеточного материала и выражали как УЕФ на лунку. Для определения количества клеток сферы растворяли в 10 мМ раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА);

30 sec, at the second stage it was 30 sec. After exposure the cryocontainers were immersed into liquid nitrogen. Thawing was performed in water bath at 37°C, the content of cryocontainers was immediately transferred into 5 ml of 0.5 mol FBS-based sucrose solution and during 5 min 5 ml of  $\alpha$ -MEM (Sigma) was added stepwise.

To assess the effect of exposure on the viability of MSC suspension the vials containing cells in 100  $\mu$ l of physiological saline were supplemented with 400  $\mu$ l of cryoprotectant solution containing 10% DMSO, 20–60% of ethylene glycol, 0–20% of the 1,2-PD and 0.5 sucrose (final concentration). The exposure time was 5 min, whereat the cells were washed.

Frozen-thawed spheres with MSCs were cultured for 24 hrs under conditions described above. We used not less than 100  $\mu$ l of culture medium per one sphere with MSCs.

Metabolic activity of eMSCs was assessed by the degree of recovery of redox indicator Alamar Blue™ (AB; Serotec, USA) in the same spheres prior to cryopreservation, immediately after thawing and in a day of culture after thawing. For this purpose the wells of culture plate with spheres were supplemented with 100  $\mu$ l of 5% AB solution. The fluorescence of the reduced AB form was determined after 2 hrs of culture using a spectrofluorometer (Tecan GENios, Australia) at the excitation wavelength of 550 nm and emission wavelength of 590 nm. The data were processed with XFLUOR4 v.4.50 (Tecan GENios). The results were presented as the differences between the values of fluorescence of experimental and blank sample (5% AB solution) and expressed in arbitrary fluorescence units (AFU). To assess the metabolic activity of eMSCs-0.5 and eMSCs-1.2 we used the same amount of encapsulated cell material and expressed it as AFU per well. To determine the number of cells the spheres were dissolved in 10 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma), the cells were counted in Goryaev's chamber. The effect of cryopreservation on metabolic state of cells involved in eMSCs-1.2 was estimated by AB test in the same spheres and expressed in percentage as AFU per one sphere after cryopreservation/AFU per one sphere before cryopreservation.

Viability of eMSCs was assessed by MTT assay, in 24 hrs of culture after encapsulation we compared the indices of eMSCs-0.5 and eMSCs-1.2. For eMSCs-1.2 the viability was determined also after cryopreservation: into each well we placed one alginate sphere with MSCs and added 100  $\mu$ l of the medium containing MTT indicator (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) with concentration of 5 mg/ml. After 2 hrs of incubation at 37°C the spheres

«Sigma») и подсчитывали клетки из осадка в камере Горяева. При исследовании влияния криоконсервирования на метаболическое состояние клеток в составе иМСК-1,2 АВ-тест проводили на одних и тех же сферах и выражали в процентах как УЕФ на одну сферу после криоконсервирования / УЕФ на одну сферу до криоконсервирования.

Жизнеспособность иМСК оценивали с помощью МТТ-теста: через сутки культивирования после инкапсуляции сравнивали показатели иМСК-0,5 и иМСК-1,2. Для иМСК-1,2 определяли жизнеспособность также после криоконсервирования: в каждую лунку помещали по одной альгинатной сфере с МСК и далее вносили 100 мкл среды, содержащей индикатор МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид) в концентрации 5 мг/мл. После 2 ч культивирования при температуре 37°C сферы растворяли путем добавления 10 мМ раствора ЭДТА. Клетки осаждали с помощью центрифугирования при 200g в течение 7 мин. Полученный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе, подсчет клеток осуществляли в камере Горяева. Жизнеспособность определяли как отношение числа клеток, накопивших формазан, к общему числу клеток и выражали в процентах.

Статистически полученные результаты обрабатывали с использованием программного пакета «Origin 6.7». Данные представляли в виде  $(x \pm y)\%$ . Для оценки значимости различий между показателями использовали параметрический метод статистического анализа (t-критерий Стьюдента).

### Результаты и обсуждение

Метод распыления суспензии клеток в растворе 1,2%-го альгината натрия позволил получить сферы диаметром  $(0,5 \pm 0,2)$  мм, количество клеток внутри одной сферы составляло от 100 до 150. Метод покапельного внесения суспензии в полимеризационный раствор с помощью инъекционных игл дал возможность увеличить диаметр сфер до  $(1,2 \pm 0,1)$  мм и количество клеток в каждой сфере до 8000–12000. Визуальная оценка не выявила отличий между обоими вариантами инкапсуляции: размер клеток варьировал в тех же пределах, они имели преимущественно округлую форму и равномерно распределялись по объему носителя (рис. 1).

Через сутки культивирования иМСК была проведена оценка состояния клеток в сферах. Было

were dissolved by mixing with 10 mM EDTA solution. The cells were pelleted by centrifugation at 200 g for 7 min. The obtained pellet was resuspended in saline, the cells were counted in Goryaev's chamber. Viability was determined as the ratio of number of cells accumulated formazan to total number of cells and expressed in percents.

The obtained results were statistically processed using the Origin 6.7 software. The data were expressed as  $(x \pm y)\%$ . To assess the significance of differences between the indices we used parametric method of statistical analysis (Student's t-test)

### Results and discussion

Method of spraying the suspension of cells in solution of 1.2% sodium alginate allowed to get spheres with diameter  $(0.5 \pm 0.2)$  mm, the number of cells within spheres made from 100 to 150. Method of dropping the suspension into the polymerization solution using injection needles allowed to increase the diameter of spheres up to  $(1.2 \pm 0.1)$  mm and the number of cells in each sphere up to 8,000–12,000. Visual assessment revealed no differences between two options of encapsulation, cell size varied within the same ranges, they were mostly rounded and homogeneously distributed over the volume of carrier (Fig. 1).

In 24 hrs of eMSCs culture we assessed the cell state in the spheres. It has been shown that encapsulation regardless of the used method did not adversely affect cell viability, by MTT test it was above 90%. Cells in the 'small' (eMSCs-0.5) and 'large' (eMSCs-1.2) spheres reduced the AB similarly ( $(0.17 \pm 0.05)$  AFU/well and  $(0.16 \pm 0.02)$  AFU/well, respectively), indicating the same level of metabolic activity.

The spheres of 1.2 mm diameter with MSCs were cryopreserved one day later encapsulation using slow freezing or vitrification under protection of DEPS-1

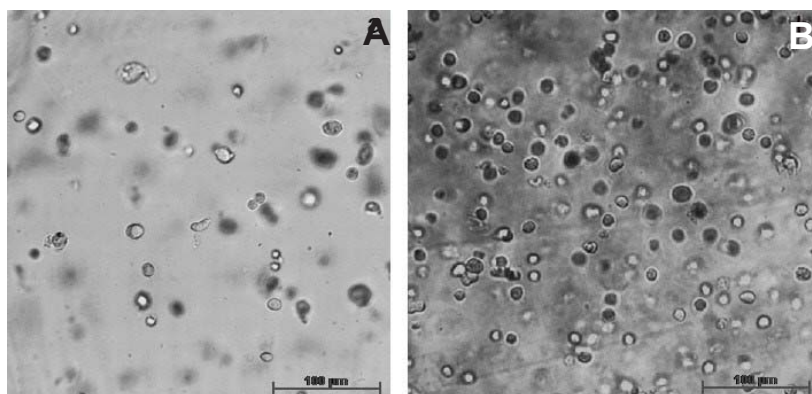


Рис. 1. Внешний вид МСК, инкапсулированных в альгинатные сферы диаметром: А –  $(0,5 \pm 0,2)$  мм; В –  $(1,2 \pm 0,1)$  мм.

Fig. 1. Appearance of MSCs encapsulated into alginate spheres with two diameters: А –  $(0.5 \pm 0.2)$  mm; В –  $(1.2 \pm 0.1)$  mm.



показано, что процесс инкапсуляции при использовании двух методов негативно не влиял на жизнеспособность клеток, по МТТ-тесту она составляла более 90%. Клетки в «малых» (иМСК-0,5) и «больших» (иМСК-1,2) сферах с аналогичной интенсивностью восстанавливали АВ (0,17 ± 0,05) УЕФ/лунка и (0,16 ± 0,02) УЕФ/лунка соответственно, что свидетельствует об одинаковом уровне метаболической активности.

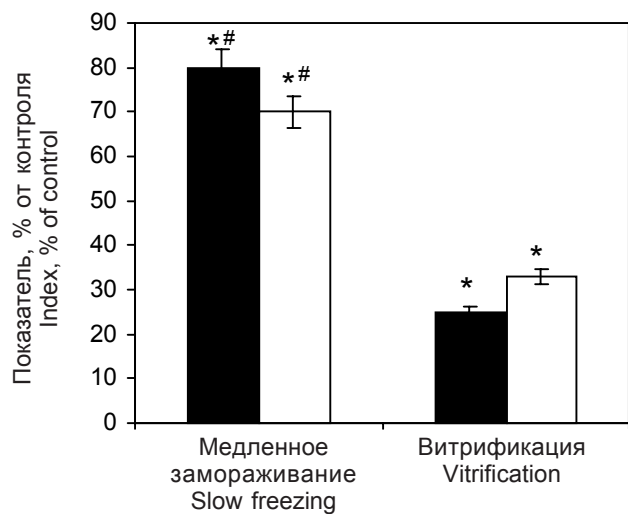
Сферы диаметром 1,2 мм с МСК через сутки после инкапсуляции криоконсервировали путем медленного замораживания или витрификации под защитой смеси ДЭПС-1, применяя методические подходы для сфер «малого» диаметра [1, 7]. При медленном замораживании использовали экспозицию иМСК с 10%-м ДМСО в среде α-МЕМ, содержащей 20% ЭС, с последующим охлаждением образцов со скоростью 1 град/мин. Витрификацию проводили под защитой смеси ДЭПС-1 с экспозицией в течение 2 мин 30 с на первом этапе и 30 с – на втором.

Результаты МТТ-теста, проведенного после криоконсервирования путем медленного замораживания, показали значимое снижение жизнеспособности иМСК на 20% по отношению к показателям до замораживания (рис. 2). Снижение метаболической активности (АВ-тест) составило около 30%. После витрификации-отогрева снижение жизнеспособности и метаболической активности иМСК было более выраженным и составило около 70%. Для криоконсервирования иМСК-1,2 применяли режимы, адаптированные ранее для сфер меньшего диаметра (0,5 мм). Медленное замораживание под защитой 10%-го ДМСО позволило сохранить жизнеспособность иМСК-0,5 на уровне (87 ± 2)% (окрашивание фенилацетатом/этидиумбромидом) [7]. Использование того же метода для иМСК-1,2 также дало приемлемые результаты. Это свидетельствует о том, что медленное замораживание может быть применено для альгинатных сфер с иМСК независимо от их диаметра.

Подход к витрификации иМСК-1,2, зарекомендовавший себя для иМСК-0,5 [1], не дал удовлетворительных результатов. На основании предыдущего опыта мы предположили, что альгинатный носитель может замедлять проникновение криопротектора в клетки. Возможно, установленная ранее для «малых» сфер оптимальная продолжительность инкубирования в растворе ДЭПС-1 до витрификации оказалась недостаточной для клеток в составе носителей большего диаметра. Для проверки такого предположения на основе скрининга были выбраны два варианта более длительной обработки раствором криопротекторов: одноэтап-

mixture, the methodical approaches were the same as for 'small' spheres [6, 7]. For slow freezing technique the eMSCs were incubated with 10% DMSO in α-MEM supplemented with 20% FBS and then the samples were cooled with the rate of 1 deg/min. Vitrification was carried out under protection of DEPS-1 mixture with exposure lasted 2 min 30 sec at the first stage and 30 sec at the second one.

The results of MTT assay performed after cryopreservation involving slow freezing showed a significant decrease in eMSCs viability by 20% in relation to the values before freezing (Fig. 2). Reduction of metabolic activity (AB test) was about 30%. Following vitrification and warming the viability and metabolic activity of eMSCs decreased more and made about 70%. To cryopreserve eMSCs-1.2 we used the regimens being previously adapted for spheres of smaller diameter (0.5 mm). Slow freezing under protection of 10% DMSO allowed to get high viability of eMSCs-0.5, (87 ± 2)% (staining with phenylacetate/ethidium bromide) [6]. Applying the same method for eMSCs-1.2 also gave satisfactory results. In other words, this indicates the



**Рис. 2.** Жизнеспособность иМСК-1,2 мм по МТТ-тесту (■) и метаболическая активность по АВ-тесту (□) после криоконсервирования с использованием медленного замораживания под защитой 10% ДМСО или витрификации в растворе ДЭПС-1; за 100% приняты значения, полученные до криоконсервирования; \* – различия значимы по отношению к показателям до криоконсервирования ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ), # – показателям после витрификации ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

**Fig. 2.** Viability of eMSCs-1.2 mm by MTT assay (■) and metabolic activity by AB test (□) after cryopreservation using slow freezing under 10% DMSO protection or vitrification in DEPS-1 solution; the values obtained before cryopreservation are denoted as 100%; \* – the differences are significant in relation to the indices prior to cryopreservation ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), # – the indices after vitrification ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

Жизнеспособность по МТТ-тесту и метаболическая активность по АВ-тесту иМСК-1,2 после витрификации-отогрева с использованием различных протоколов экспозиции  
Viability by MTT assay and metabolic activity by AB test of eMSCs-1.2 after vitrification-warming using different exposure protocols

Протокол криоконсервирования Cryopreservation protocol	Показатели непосредственно после отогрева Indices immediately after warming		Показатели через сутки культивирования после отогрева Indices in 24 hrs culture post warming	
	АВ, %	МТТ, %	АВ, %	МТТ, %
Витрификация в ДЭПС-1 после инкубации в один этап в течение 5 мин Vitrification in DEPS-1 after one step incubation for 5 min	63,0 ± 2,1 <sup>1</sup>	82,0 ± 1,3 <sup>1</sup>	56 ± 2,1 <sup>1,2</sup>	75,0 ± 1,5 <sup>1</sup>
Витрификация в ДЭПС-1 после инкубации в два этапа (4 мин на первом этапе, 30 с – на втором) Vitrification in DEPS-1 after two step incubation(4 min at the first step, 30 sec at the second step)	55,00 ± 2,14 <sup>1,2</sup>	74,0 ± 2,52 <sup>1,2</sup>	47,00 ± 2,54 <sup>1,2,3</sup>	67,00 ± 3,12 <sup>1,2,3</sup>
Замораживание в растворе 10% ДМСО с низкой контролируемой скоростью Freezing in solution of 10% DMSO with low controlled rate	70,00 ± 2,18 <sup>1,2</sup>	80,0 ± 3,1*	42,00 ± 1,78 <sup>1,2,3</sup>	55,0 ± 2,3 <sup>1,2,3</sup>

**Примечание:** за 100% приняты значения до криоконсервирования; <sup>1</sup> – различия значимы по отношению к показателям до криоконсервирования ( $p < 0,05$ ), <sup>2</sup> – после отогрева ( $p < 0,05$ ), <sup>3</sup> – витрификации с одноэтапной инкубацией в ДЭПС-1 ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

**Note:** the indices prior to cryopreservation are denoted as 100%; <sup>1</sup> – differences are significant in relation to the indices before cryopreservation ( $p < 0.05$ ), <sup>2</sup> – after thawing ( $p < 0.05$ ), <sup>3</sup> – vitrification after one-step incubation in DEPS-1 ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

ной с экспозицией в 100% ДЭПС-1 в течение 5 мин и двухэтапной с 4-минутной экспозицией в 50% ДЭПС-1 на первом этапе и 30 с в 100% ДЭПС-1 – на втором.

Как оказалось, использование обоих вариантов действительно позволило значительно увеличить показатели как жизнеспособности, так и метаболической активности иМСК после витрификации и отогрева (таблица). Более того, было обнаружено некоторое преимущество одноэтапного протокола экспозиции – средние показатели жизнеспособности и метаболической активности после витрификации и отогрева клеток, обработанных раствором ДЭПС-1 в течение 5 мин, были выше таковых для случая двухэтапной экспозиции в смеси криопротекторов в течение 4 мин на первом этапе и 30 с – на втором. Такие различия важны с технологической точки зрения: очевидно, что одноэтапный протокол экспозиции в растворе криопротекторов является более простым по сравнению с двухэтапным. Интересно, что такая продолжительная инкубация в случае неинкапсулированной суспензии клеток приводила к полной их гибели (жизнеспособность на уровне  $(4 \pm 2)\%$ ), вследствие высокой концентрации криопротекторов в растворе. Можно предположить, что высокие значения жизнеспособности и метаболической активности клеток, полученные после их витрификации в составе альгинатных сфер, могут быть обусловле-

slow freezing as applicable for the alginate spheres with eMSCs regardless of their diameter.

The approach tested for vitrification of eMSCs-1.2 which was developed for eMSCs-0.5 [7] did not give satisfactory results. Based on the previous experience we assumed that the alginate carrier might decelerate the penetration of cryoprotectant into the cells. Probably the duration of incubation in DEPS-1 solution prior to vitrification established previously as optimal for 'small' spheres was insufficient for cells placed into the carriers of larger diameter. To verify this assumption we performed screening and selected two options of longer treatment with cryoprotectant solution: one-step exposure in 100% DEPS-1 for 5 min, and two-step 4-min exposure in 50% DEPS-1 at the first stage and 30 sec in 100% DEPS-1 at the second stage.

As it was found, both options of treatment allowed to increase considerably the indices of viability and metabolic activity of eMSCs following vitrification and warming (Table). Moreover, we have found an advantage of one-step exposure protocol, *i. e.* average metabolic activity and viability of eMSCs after vitrification and thawing of the cells treated with DEPS-1 solution for 5 min were higher than those in the case of two-step exposure in a mixture of cryoprotectants for 4 min at the first stage and 30 sec at the second one. Such differences are important from a technological point of view, it is obvious that one-step protocol of exposure



ны способностью альгинатного гидрогеля снижать негативное влияние на клетки. Этот вопрос требует отдельного изучения, поскольку его решение может существенно повысить эффективность криоконсервирования биологических объектов.

Жизнеспособность и метаболическая активность клеток, определенные непосредственно после отогрева, не могут считаться адекватными показателями криоконсервирования. Известно, что в течение некоторого времени после отогрева в части клеток развиваются деструктивные процессы, инициированные во время криоконсервирования. Так, отмечена активация каскада апоптоза после отогрева клеточной суспензии, что приводит к дополнительному снижению ее жизнеспособности в течение последующих суток [9]. Также нами было установлено, что в ходе рекультивирования МСК после криоконсервирования в составе макропористых носителей показатель жизнеспособности суспензии снижается и достигает минимума к концу первых суток, а затем увеличивается, очевидно, вследствие пролиферации выживших клеток [4]. По результатам исследования установлено, что через сутки рекультивирования после витрификации и отогрева «больших» сфер показатели жизнеспособности и метаболической активности были ниже на 7–8% по сравнению с таковыми непосредственно после отогрева. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сохранении морфофункциональных свойств МСК, перенесших процедуру витрификации в составе альгинатных микросфер, однако необходимо дальнейшее усовершенствование методов криоконсервирования, предотвращающих снижение показателей жизнеспособности клеток в ходе рекультивирования.

## Выводы

Мезенхимальные стромальные клетки могут быть инкапсулированы в альгинатные сферы разного диаметра ( $0,5 \pm 0,2$ ) и ( $1,2 \pm 0,1$ ) мм с сохранением жизнеспособности и метаболической активности.

Витрификация МСК в составе сфер разного диаметра во многом определяется временем экспозиции с раствором криопротекторов. С увеличением диаметра сфер с ( $0,5 \pm 0,2$ ) до ( $1,2 \pm 0,1$ ) мм время экспозиции, необходимое для сохранения жизнеспособности и метаболической активности клеток после витрификации, тоже увеличивалось.

Показатели жизнеспособности и метаболической активности МСК, заключенных в альгинатные сферы разного диаметра, могут быть сохранены при криоконсервировании как путем медленного замораживания, так и витрификации.

in the solution of cryoprotectants is simpler if compared to a two-step one. Interestingly, that such a continuous incubation of non-encapsulated cell suspension resulted in their complete death (viability of  $(4 \pm 2)\%$ ), likely due to high concentration of cryoprotectants in solution. It can be suggested that high values of cell viability and metabolic activity obtained after vitrification within the alginate spheres could result from the ability of alginate hydrogel to reduce negative effects on the cells appeared during cryopreservation. This question requires a more detailed individual study, as its solving can significantly improve the efficiency of cryopreservation of biological objects.

Viability and metabolic activity of cells assessed immediately after thawing could not be considered as reliable indices of cryopreservation. It is known that the destructive processes initiated during cryopreservation are developed in the cells during some period of time post warming. For instance, the apoptotic cascade activation after warming of cell suspension that led to a further reduction of cell viability during the following days was reported [9]. Also we have established that during reculturing of MSCs after cryopreservation within macroporous carriers the viability of suspension decreased and reached a minimum to the end of the first day and then again increased likely due to proliferation of survived cells [1]. In the present research it was revealed that following 24 hr reculturing after vitrification and warming of 'large' spheres the indices of viability and metabolic activity were lower by 7–8% if compared with those immediately after thawing. Therefore, the findings attested the preservation of morphological and functional properties of MSCs undergone vitrification within alginate microspheres, but there is a need in further improvement of cryopreservation methods preventing the decrease in cell viability during reculturing.

## Conclusions

Mesenchymal stromal cells can be encapsulated into alginate spheres of different diameters ( $0.5 \pm 0.2$ ) and ( $1.2 \pm 0.1$ ) mm preserving their viability and metabolic activity.

MSC vitrification within the spheres of various diameter is largely determined by the exposure time with the solution of cryoprotectants. With the increase in the diameter of spheres from ( $0.5 \pm 0.2$ ) to ( $1.2 \pm 0.1$ ) mm the exposure time required to maintain viability and metabolic activity of cells after vitrification also increases.

The viability and metabolic activity of MSCs involved into alginate spheres of different diameter can be preserved during cryopreservation both by slow freezing and vitrification.





## Литература

1. Зайков В.С., Петренко Ю.А., Труфанова Н.А. и др. Витрификация мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №4. – С. 14–20.
2. Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Мазур С.П. и др. Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // Трансплантология. – 2007. – Т. 9, №1. – С. 218–220.
3. Правдюк А.И., Петренко Ю.А., Волкова Н.А., Петренко А.Ю. Свойства мезенхимальных стромальных клеток человека при инкапсуляции в альгинатные микрокапсулы // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, №2. – С. 62–70.
4. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Y.A. et al. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2014. – Vol. 25, №3. – P. 857–871.
5. Murua A., Portero A., Orive G. et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application // J. Control. Rel. – 2008. – Vol. 132, №4. – P. 76–83.
6. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – Vol. 284, №5411. – P. 143–147.
7. Pravdyuk A.I., Petrenko Y.A., Fuller B.J., Petrenko A.Y. Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells // Cryobiology. – 2013. – Vol. 66, №3. – P. 215–222.
8. Zimmermann H., Shirley S.G., Zimmerman U. Alginate-based encapsulation of cells: past, present and future // Cur. Diabetes Rep. – 2007. – Vol. 7, №4. – P. 314–320.
9. Wagh V., Meganathan K., Jagtap S. et al. Effects of cryopreservation on the transcriptome of human embryonic stem cells after thawing and culturing // Stem Cell Rev. – 2011. – Vol. 7. – P. 506–517.

## References

1. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Y.A. et al. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds. J Mater Sci Mater Med. 2014; 25(3): 857–871.
2. Murua A., Portero A., Orive G. et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. J Control Rel 2008; 132(4): 76–83.
3. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284(5411): 143–147.
4. Petrenko A.Y., Petrenko Y.A., Mazur S.P. et al. Isolation and multilineage differentiation of stromal cells from fetal and adult tissue. Transplantation 2007; 9(1): 218–220.
5. Pravdyuk A.I., Petrenko Y.A., Volkova N.A., Petrenko A.Y. Properties of human mesenchymal stromal cells in alginate microcapsules. Biotekhnologiya 2010; 3(2): 62–70.
6. Pravdyuk A.I., Petrenko Y.A., Fuller B.J., Petrenko A.Y. Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells. Cryobiology 2013; 66(3): 215–222.
7. Zaikov V.S., Petrenko Y.A., Trufanova N.A. et al. Cryopreservation of human mesenchymal stromal cells in suspension and encapsulated in alginate microbeads by vitrification in multicomponent solutions. Probl Cryobiol Cryomed 2012; 22(4): 14–20.
8. Zimmermann H., Shirley S.G., Zimmerman U. Alginate-based encapsulation of cells: past, present and future. Cur Diabetes Rep 2007; 7(4): 314–320.
9. Wagh V., Meganathan K., Jagtap S. et al. Effects of cryopreservation on the transcriptome of human embryonic stem cells after thawing and culturing. Stem Cell Rev 2011; 7: 506–517.

