Влияние высокомолекулярных полимеров на жизнеспособность, метаболическую активность и способность к мультилинейной дифференцировке мезенхимальных стромальных клеток, криоконсервированных в отсутствие ДМСО

В.В. Муценко, Е.Ю. Рогульская, Д.Н. Тарусин, Ю.А. Петренко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Impact of High Molecular Weight Polymers on Viability, Metabolic Activity and Multilineage Differentiation Ability of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved in Me_2SO Absence

V.V. Mutsenko, E.Yu. Rogulska, D.N.Tarusin, Yu.A. Petrenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) по разработанному нами методу, включающему комплексное использование сахарозы, позволяет достичь показателей жизнеспособности клеток на уровне 45% в отсутствие проникающих криопротекторов. В настоящей работе исследовали возможность повышения эффективности данного метода за счет введения высокомолекулярных полимеров.

В работе использовали МСК кожи человека 6–8 пассажей. Предобработка заключалась в культивировании клеток в присутствии 0,2 М сахарозы в течение 24 ч до замораживания. В криозащитную среду вносили сахарозу в концентрации 0,3 М и один из следующих полимеров: фиколл (м. м. 400 000), декстран (м. м. 40 000), ГЭК (м. м. 200 000) и ПЭГ (м. м. 8000). Замораживание МСК осуществляли со скоростью 1 град/мин до –80°С, после чего образцы погружали в жидкий азот. После отогрева производился посев клеток без этапа отмывки. Сохранность клеток определяли путем окрашивания трипановым синим. Жизнеспособность и метаболическую активность клеток оценивали по уровню восстановления Alamar Blue. После культивирования в соответствующих индуктивных средах оценивали дифференцировочный потенциал МСК по окрашиванию на щелочную фосфатазу и нейтральные липиды.

Установлено, что введение в сахарозосодержащую среду криоконсервирования фиколла, декстрана или ГЭК в концентрациях от 1 до 6% не значительно предотвращало гибель клеток, предобработанных сахарозой. В то же время присутствие ПЭГ-8000 в криозащитной среде приводило к концентрационно-зависимому увеличению сохранности. Максимальные показатели жизнеспособности и метаболической активности клеток (65 и 60%, соответственно), были получены при использованиии 6%-го раствора ПЭГ-8000. В условиях монослойного культивирования клетки, криоконсервированные под защитой сахарозы и ПЭГ-8000, были способны к адгезии, пролиферации и дифференцировке в остео- и адипогенном направлениях.

Таким образом, скрининг высокомолекулярных полимеров показал, что ПЭГ-8000 позволяет повысить эффективность криоконсервирования МСК в отсутствие ДМСО.

Cryopreservation of mesenchymal stromal cells (MSCs) according to the technique we previously developed, involved a complex application of sucrose and allowed to achieve cell viability rates at the level of about 45% in the absence of penetrating cryoprotectants. The aim of present work was to assess the possible enhancement of the efficiency of the technique by introducing high molecular weight polymers.

Skin derived human MSCs of 6–8 passages have been used in the study. The pretreatment step included cell culturing in the presence of 0.2 M sucrose during 24 hrs prior to freezing. Sucrose in the concentration of 0.3 M and one of the following polymers such as ficoll (MW 400,000), dextran (MW 40,000), HES (MW 200,000) and PEG (MW 8000) were introduced into cryoprotective medium. The freezing of MSCs was performed with the cooling rate of 1 deg/min down to –80°C with following plunging of the samples into liquid nitrogen. After thawing cells were seeded without any washing step. Cell survival was determined by trypan blue staining. Cell viability and metabolic activity were estimated by the level of Alamar Blue reduction. Differentiation potential of MSCs was evaluated after culturing in the corresponding inductive media by staining for alkaline phosphatase and neutral lipids.

It was found that the introduction of ficoll, dextran or HES in the concentration range of 1–6% into sucrose-containing cryopreservation medium insignificantly prevented the death of sucrose-pretreated cells. At the same time the presence of PEG-8000 in cryoprotective medium led to concentration-dependent increase in cell survival. Maximum rates of cell viability and metabolic activity (65 and 60%, respectively) were obtained in case of using 6% solution of PEG-8000 . During monolayer culture the cells cryopreserved under protection of sucrose and PEG-8000 were able to adhere, proliferate and differentiate into osteo- and adipogenic directions.

Thus, screening of high molecular weight polymers has shown that PEG-8000 allows to enhance the effectiveness of MSCs cryopreservation in the absence of Me_2SO.