

Предобработка сахарозой повышает криоустойчивость мезенхимальных стромальных клеток, криоконсервированных на двух- и трехмерных носителях

В.В. Муценко¹, А.П. Гришков², Е.Ю. Рогульская¹, Ю.А. Петренко¹

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

²Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

Pretreatment with Sucrose Increases Cryoresistance of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved on Two- and Three-Dimensional Carriers

V.V. Mutsenko¹, A.P. Gryshkov², E.Yu. Rogulskaya¹, Yu.A. Petrenko¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Institute of Multiphase Processes, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany

Широкое использование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в тканевой инженерии создает предпосылки для разработки методов криоконсервирования тканевых эквивалентов на их основе, позволяющих обеспечить высокую жизнеспособность клеток. Ранее нами было показано положительное действие предобработки сахарозой на выживаемость МСК в суспензии после криоконсервирования без добавления диметилсульфоксида (ДМСО) и эмбриональной сыворотки.

Целью данной работы было определить влияние предобработки сахарозой на эффективность криоконсервирования МСК на двух- и трехмерных носителях в присутствии ДМСО.

Двухмерная культура МСК была представлена монослоем клеток, растущих на покровных стеклах, трехмерная – клетками в хитиновых носителях. Образцы культивировали в 0,1–0,2 М сахарозе, замораживали со скоростью 1 град/мин в среде, содержащей сахарозу в концентрации 0,1–0,5 М и/или 10% ДМСО. Для оценки сохранности клетки окрашивали трипановым синим (монослой, суспензия), а для определения метаболической активности использовали Alamar Blue тест (носители).

Установлено, что криоконсервирование с применением 10% ДМСО позволило сохранить (92,0 ± 2,0)% клеток в суспензии. В то же время при криоконсервировании МСК, адгезированных и распластанных на покровных стеклах, сохранность составляла (15,8 ± 5,8)%, а метаболическая активность клеток в составе хитиновых матриц – (40,1 ± 8,9)%. Предобработка МСК сахарозой и последующее их криоконсервирование в присутствии 0,3 М сахарозы и 10% ДМСО повышали указанные показатели в монослое до (53,0 ± 8,2)% и составе трехмерных матриц – до (56,0 ± 12,2)%.

С целью выяснения механизмов действия предобработки исследовали проникновение [¹⁴C]-сахарозы в МСК, поведение клеток в культуре и экспрессию митоген- и стресс-индуцируемой киназы фосфо-p38. Показано, что сахароза проникает внутрь клеток, где, очевидно, оказывает криозащитное действие. Присутствие сахарозы в среде культивирования не влияет на морфологию МСК и характер их движения на поверхности пластика. Кроме того, в условиях предобработки установлена временная активация киназы p38, что указывает на возможное участие стресс-белков в реализации криозащитного действия сахарозы.

Таким образом, предобработка сахарозой является перспективным подходом для дальнейшей разработки методов криоконсервирования МСК на двух- и трехмерных носителях.

The widespread use of mesenchymal stromal cells (MSCs) in tissue engineering requires the development of the cryopreservation methods for MSC-based tissue equivalents, which would provide a high cell viability. We have previously shown the positive effect of pretreatment with sucrose on the post-thaw survival of MSCs in the suspension without dimethyl sulfoxide (DMSO) and fetal calf serum.

The aim of this study was to examine the effect of sucrose pretreatment on the efficiency of MSCs cryopreservation in two- and three-dimensional carriers in presence of DMSO.

Two-dimensional culture of MSCs was a cell monolayer on coverslips, three-dimensional one was represented by the cells in the chitin carriers. The samples were cultured in 0.1–0.2 M sucrose and frozen with 1 deg/min rate in a medium with 0.1–0.5 M sucrose and/or 10% DMSO. The survival of the cells was assessed by trypan blue staining (monolayer or suspension), the metabolic activity was estimated by Alamar Blue test (carriers).

It has been found that cryopreservation using 10% DMSO enabled to preserve (92.0 ± 2.0)% of cells in suspension. Cryopreservation of the MSCs adhered and spread on the coverslips allowed to preserve (15.8 ± 5.8)% cells, the metabolic activity of cells within chitin matrices made (40.1 ± 8.9)%. Pretreatment of MSCs with sucrose and subsequent cryopreservation in the presence of 0.3 M sucrose and 10% DMSO allowed to increase these values for the cells in monolayer up to (53.0 ± 8.2)% and in the three-dimensional matrix up to (56.0 ± 12.2)%.

In order to elucidate the mechanisms of pretreatment effect we have studied the penetration of [¹⁴C]-sucrose into MSCs, the behavior of cells in culture and the expression of mitogen- and stress-activated p38 kinase. It has been shown that sucrose penetrates into cells, where it obviously renders a cryoprotective effect. The presence of sucrose in the culture medium does not affect the MSC morphology and their movement on the tissue culture plastic surface. Moreover, the pretreatment results in a time-dependent change in p38 activation, indicating a possible involvement of stress proteins into sucrose cryoprotective effect.

Thus, the pretreatment with sucrose is a promising approach which could be used for further development of the methods to cryopreserve the MSCs on two- and three-dimensional carriers.

