

## Новый подход к криоконсервированию мезенхимальных стромальных клеток

Ю.А. ПЕТРЕНКО, В.В. МУТЕНКО, С.П. МАЗУР, В.П. ГРИШУК, Н.А. ВОЛКОВА  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## New Approach to Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells

YU.A. PETRENKO, V.V. MUTSENKO, S.P. MAZUR, V.P. GRISCHUK, N.A. VOLKOVA  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Перспектива широкого клинического применения мезенхимальных стромальных клеток (МСК) определяет необходимость создания новых и совершенствования существующих методов криоконсервирования этих клеток.

Эффективными при замораживании МСК являются криозащитные среды, содержащие ДМСО и эмбриональную сыворотку ксеногенного происхождения, которые следует удалять перед применением. Это усложняет процесс криоконсервирования и может приводить к значительной потере клеток. При криоконсервировании клеток в качестве непроницающего нетоксичного осмотически активного компонента среды замораживания часто используется сахароза. Целью данной работы явилось исследование целесообразности использования сахарозы при культивировании МСК для подготовки клеток к криоконсервированию и снижения концентрации нежелательных компонентов в криозащитной среде.

Объектом изучения были МСК 4–7 пассажей, полученные ранее с соблюдением норм биомедицинской этики. Для подготовки клеток к криоконсервированию проводили культивирование МСК в присутствии 0,1; 0,15 и 0,2 М сахарозы в течение 1 суток перед замораживанием. Замораживание МСК осуществляли со скоростью 1 град/мин до  $-80^{\circ}\text{C}$ , после чего образцы погружали в жидкий азот. Сохранность клеток определяли по тесту трипанового синего. Метаболическую активность оценивали с использованием редокс-индикаторов МТТ и АВ.

Установлено, что культивирование МСК в присутствии сахарозы приводило к значительному увеличению их криоустойчивости. Даже при отсутствии в криозащитной среде ДМСО и сыворотки около 50% клеток после замораживания-отогрева сохраняли жизнеспособность, проявляли метаболическую активность и были способны к адгезии и пролиферации в условиях монослойного культивирования. Введение всего 1% ДМСО в криозащитную среду при условии предварительной обработки монослоя МСК сахарозой приводило к достоверному повышению жизнеспособности, метаболической и пролиферативной активности отогретых клеток до значений, характерных для МСК, криоконсервированных под защитой 10% ДМСО в присутствии сыворотки.

Полученные результаты указывают на целесообразность этапа предобработки культивируемых МСК для подготовки клеток к последующему криоконсервированию.

The prospect of widespread clinical application of mesenchymal stromal cells (MSCs) determines the need to develop new and improve existing methods of cryopreservation of these cells.

The cryoprotective media effective for cryopreservation of MSCs usually contain DMSO and fetal serum of xenogeneic origin that should be removed prior to use. This complicates the cryopreservation protocol and can lead to a significant loss of cells. Sucrose is often used as a non-toxic non-penetrating osmotically active component of freezing medium during cryopreservation of cells.

The aim of the study was to investigate the feasibility of sucrose application during MSC culturing for the preparation of cells for cryopreservation and following reduction of undesirable components concentration in the cryoprotective medium.

The objects of the study were MSCs of 4–7<sup>th</sup> passages obtained previously according to the principles of biomedical ethics. To prepare cells for cryopreservation MSC culturing was performed in the presence of 0.1, 0.15 and 0.2 M sucrose during a 24 hrs prior to freezing. MSC cryopreservation was performed with the cooling rate of 1 deg/min down to  $-80^{\circ}\text{C}$ , then the samples were plunged into liquid nitrogen. Cell survival was determined by trypan blue test. Metabolic activity was evaluated using the redox indicators MTT and AB.

We have found that the culturing of MSCs in the presence of sucrose led to a significant increase of cells cryoresistance. Even when DMSO and serum were absent in cryoprotective medium about 50% of the cells after freeze-thawing preserved their viability, revealed a metabolic activity and were capable to adhesion and proliferation during monolayer culturing. Introduction of 1% DMSO in cryoprotective media after pre-treatment of MSC monolayer with sucrose resulted in a significant increase of viability, metabolic and proliferative activity of thawed cells up to the levels of MSCs cryopreserved under protection of 10% DMSO in the pre-sence of serum.

The obtained results indicate the feasibility of pre-treatment stage during MSC culture for the preparation of cells to the following cryopreservation.