

Криоконсервирование мезенхимальных стволовых клеток приматов с использованием антиоксидантов как дополнительных криопротекторов

Н. Хофманн¹, Т. Мюллер², Д. Погожих^{1,3}, Б. Гласмахер¹

¹Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

²Институт трансфузионной медицины, Высшая медицинская школа Ганновера, Ганновер, Германия

³Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Primate Mesenchymal Stem Cells With Antioxidants as Additional CPA

N. Hofmann¹, T. Mueller², D. Pogozykh^{1,3}, B. Glasmacher¹

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

²Institute for Transfusion Medicine, Hannover Medical School, Hannover, Germany

³Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Kharkov, Ukraine

Стволовые клетки могут использоваться в клинической терапии и регенеративной медицине. Одной из основных проблем, касающихся применения этих клеток, является разработка эффективного протокола криоконсервирования, так как используемые в настоящее время методы обеспечивают низкие жизнеспособность и уровень дифференцировки. Высокая выживаемость зависит от выбора оптимальной скорости охлаждения, соответствующего криопротектора (КП) в необходимой концентрации. Однако наиболее широко используемый КП диметилсульфоксид (ДМСО) токсичен при высоких концентрациях и оказывает негативное влияние на биологическую функцию клетки. Таким образом, значительный интерес представляет разработка новых стратегий криозащиты с заменой используемых в настоящее время КП или уменьшением их концентрации. Поскольку одним из основных повреждающих факторов является наличие активных форм кислорода во время и после оттаивания, мы исследовали добавление аскорбиновой кислоты и α -токоферола в качестве потенциальных антиоксидантов.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) игрунки обыкновенной (*Callithrix jacchus*) замораживали в 200 мкл ПЦР-пробирках 200 мкл (5×10^5 клеток/мл) с оптимальной скоростью охлаждения (полученной в параллельном исследовании) в μ -замораживателе. Различные концентрации аскорбиновой кислоты (50, 100 и 250 мкмоль) и α -токоферола (100, 200 и 500 мкмоль) были изучены отдельно или в комбинации с ДМСО (2.5 и 5% об.). Клетки, прикрепившиеся к поверхности культурального флакона, после 24 ч рекультивирования считались жизнеспособными, выживаемость сравнивали с клетками, замороженными с ДМСО (положительный контроль). Далее выжившие клетки проверяли на способность к дифференциации.

Добавление 200 мкмоль α -токоферола увеличивало выживаемость МСК приматов после криоконсервирования даже с 2,5% ДМСО. С использованием 100 мкмоль α -токоферола и 5% ДМСО сохранность была в два раза выше, чем с добавлением только 5% ДМСО. Аскорбиновая кислота незначительно влияла на выживаемость МСК. Внутриклеточные липосомы были четко окрашены масляным красным О, что доказывало способность к адипогенной дифференцировке МСК игрунок обыкновенных после криоконсервирования с добавлением антиоксидантов.

Мы благодарим Л. Смита и Б. Зингерофа за оказанную техническую помощь. Эта работа финансируется Немецким научно-исследовательским обществом для кластера передового опыта REBIRTH (EXC 62/1).

Stem cells have potential use in clinical therapy and regenerative medicine. One of the major challenges regarding the application of these cells is the development of an efficient cryopreservation protocol, since currently used methods exhibit poor viability and differentiation rates. A high survival rate is a function of optimal cooling rate, appropriate cryoprotective agent (CPA) and its adjusted concentration. The most widely used CPA, dimethyl sulfoxide (Me_2SO), however is toxic at high concentrations and has detrimental effects on the biological functioning of a cell. Therefore, it is of great interest to develop new cryoprotective strategies to replace currently used CPAs or to reduce their concentration. Since one of the major damaging factors is the occurrence of reactive oxygen species during and after thawing we have investigated the addition of ascorbic acid and α -tocopherol as potential antioxidants.

Mesenchymal stem cells (MSC) from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) were frozen in 200 μl PCR-tubes (5×10^5 cells/ml) with optimal cooling rate (gained from a parallel study) in a μ -freezer device. Different concentrations of ascorbic acid (50, 100 and 250 mM) and α -tocopherol (100, 200 and 500 μM) were studied exclusive or in combination with Me_2SO (2.5 and 5% v/v). Cells attached to the culture flask surface after 24 h recultivation were considered as viable, the survival rate was compared to that of cells frozen with Me_2SO as positive control. Survived cells were further tested for differentiation capability.

The addition of 200 μM α -tocopherol improved the survival of primate MSCs after cryopreservation even with 2.5% Me_2SO . With 100 μM α -tocopherol and 5% Me_2SO survival was more than two fold higher than with 5% Me_2SO alone. Ascorbic acid had no considerable effect on the survival rate of MSCs. Intracellular lipid vesicles were clearly stained by Oil Red O and proved the adipogenic differentiation capability of marmoset MSCs after cryopreservation with antioxidant addition.

Accessory application of α -tocopherol improved survival and proliferation of MSCs from the marmoset monkey after cryopreservation. Me_2SO could be reduced to moderate concentrations. These findings will be transferred on the cryopreservation of induced pluripotent stem cells in further studies.

We thank L. Smits and B. Zingerov for their outstanding technical assistance. This work is supported by funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft for the Cluster of Excellence REBIRTH (EXC 62/1).