

Перспективы использования криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток и макропористых губок на основе криогелей агарозы и альгината для тканевой инженерии

Ю.А. ПЕТРЕНКО¹, Л.Г. ДАМШКАЛН², В.И. ЛОЗИНСКИЙ², А.Ю. ПЕТРЕНКО¹

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

² Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва

Perspectives in Using Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells and Agarose Cryogel- and Alginate-Based Macroporous Sponges for Tissue Engineering

YU.A. PETRENKO¹, L.G. DAMSHKALN², V.I. LOZINSKY², A.YU. PETRENKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds
of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Тканевая инженерия – быстро развивающееся направление биотехнологии, основанное на использовании комплекса клеток и биоматериалов различной природы для создания *in vitro* функционирующих тканей для последующей трансплантации. В качестве “клеточной” составляющей наиболее перспективными являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), способные к направленной дифференцировке в различные типы клеток. В качестве носителей МСК целесообразно использовать пористые губки на основе полимеров.

В данной работе оценена возможность использования новых макропористых губок на основе криогелей агарозы и альгината в качестве носителей МСК, предварительно подвергнутых криоконсервированию.

В работе использовали криоконсервированные МСК костного мозга человека 4–6-го пассажа. Иммунофенотип клеток определяли с использованием проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD Biosciences). Макропористые губки (МГ) на основе криогелей агарозы или альгината изготавливали согласно методике, разработанной Лозинским В.И. и соавт. (Пат. РФ № 2220987). При этом МГ содержали различные концентрации (0,125, 0,25 и 0,5%) желатина. МСК помещали в МГ с использованием различных подходов и культивировали в течение 1–4 недель. Метаболическую и пролиферативную активность МСК в трехмерных носителях определяли с использованием Alamar Blue (AB) теста.

Иммунофенотипический анализ показал, что клетки обладают специфическим для МСК фенотипом (CD29⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻). При заселении МСК в МГ на основе криогеля альгината было установлено, что содержание желатина в составе МГ существенно влияет на метаболическую и пролиферативную активность клеток при культивировании. Наиболее высокими показателями пролиферативной активности обладали МСК в губках с ковалентно присоединенным желатином. Клетки, культивированные в криогелевых губках на основе агарозы с ковалентно присоединенным желатином, также обладали высокой адгезивной и пролиферативной активностью. Гистологические исследования не выявили существенных различий в распределении клеток внутри МГ, состоящих из агарозы и альгината.

Таким образом, криоконсервированные мезенхимальные стромальные клетки и макропористые криогелевые губки на основе альгината и агарозы являются перспективными компонентами для разработки биоинженерных конструкций соединительной ткани.

Tissue engineering is an actual and rapidly developing direction in biotechnology, based on using cell and biomaterial complex of different origin to create the *in vitro* functioning tissues for following transplantation. The multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs), capable of a directed differentiation into different cell types are the most perspective ones as “cell” component. Porous sponges on different polymer base may be used as the carriers for MSCs.

The possibility to use the new macroporous sponges on agarose and alginate cryogel base as 3D MSCs carriers, preliminarily subjected to cryopreservation, has been estimated in this research.

Human bone marrow cryopreserved MSCs of 4–6 passages have been used in the research. Cell immune phenotype was determined with flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences). Macroporous sponges (MS) on agarose and alginate cryogel base were produced according to the methods, designed by Lozinsky V.I. (RF Pat. N 220987). At the same time MS comprised different gelatin concentrations (0.125, 0.25, 0.5%). MSCs were placed into MS with applying different approaches and cultured for 1–4 weeks.

Metabolic and proliferative activities of MSCs in 3D carriers were determined with Alamar Blue (AB) test.

The immune phenotype analysis has demonstrated cells to have the phenotype, specific for MSCs (CD29⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺ and CD34⁻, CD45⁻). When inoculating MSCs into MS on alginate cryogel base, the gelatin content as a part of MS was established as significantly affecting the metabolic and proliferative cell activities during culturing. MSCs in sponges with covalently associated gelatin had the highest indices of proliferative activity. Cells, cultured in agarose-based cryogel sponges with covalently associated gelatin, had a high adhesive and proliferative activities as well. No significant differences in cell distribution inside MS, consisting of agarose and alginate, were revealed during histological studied.

Thus, cryopreserved mesenchymal stromal cells and alginate- and agarose-based macroporous cryogel sponges are the perspective component to design bioengineered constructions of connective tissue.