

## Гипотермическое хранение и криоконсервирование в технологии получения фибробластов из кожи человека

UDC 615.014.41:611.018.22:57.085.23

L.G. ABRAFIKOVA\*, T.F. PETRENKO, I.P. VYSEKANTSEV

## Hypothermic Storage and Cryopreservation in Technology of Obtaining Human Skin Fibroblasts

Аллогенные фибробласты успешно применяются в различных областях медицины [1–3]. Источниками их получения являются эмбриональные ткани и кожа человека. Однако применение в клеточной терапии фибробластов из эмбриональных тканей затруднено нравственно-этическими и правовыми проблемами. При использовании фибробластов из биоптатов кожи доноров вероятно возникновение иммунных реакций реципиента. Это обусловило разработку технологий с использованием аутофибробластов.

В процессе получения и использования аутофибробластов в клинической практике существует необходимость гипотермического хранения и криоконсервирования кожных биоптатов и культур фибробластов.

Цель работы – изучение возможности получения фибробластов из кожи человека после ее гипотермического хранения или криоконсервирования, а также исследование влияния условий гипотермического хранения и криоконсервирования на фибробласты.

### Материалы и методы

Объектами исследования были биоптаты кожи доноров-добровольцев или хирургические остатки кожи после проведения плановых операций. Забор биоптатов проводили с соблюдением правил асептики. В стерильных условиях биоптаты измельчали на кусочки размером 0,1×0,1 см и помещали в соответствующие среды: раствор Хенкса; среда 199 с 10% сыворотки крови донора; сыворотка крови донора. Биоптаты в указанных средах хранили при температуре 4°C.

Биоптаты каждые 7 суток извлекали из сред хранения, небольшие фрагменты помещали в чашку Петри, добавляли среду 199 с 10% эмбриональной сыворотки (фирма “Биолот”, Россия) и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Allogenic fibroblasts have been successfully applied in different fields of medicine [1–3]. The sources of their deriving are human embryonic tissues and skin. However during application of fibroblasts in cell therapy moral and ethical, as well as legislative problems appear. When using fibroblast from donor's skin bioplates the appearance of immune reactions of a recipient is probable. This stipulated the development of protocols with application of autologous fibroblasts.

For the technique of obtaining the autologous fibroblasts and their use in clinical practice there is the necessity of hypothermic storage and cryopreservation of skin bioplates and fibroblast cultures.

The research aim was to study the possibility of obtaining the fibroblasts from human skin either after its hypothermic storage or cryopreservation as well as investigation of the effect of hypothermic storage and cryopreservation on fibroblasts.

### Materials and methods

The research object were either skin bioplates of volunteer donors, or surgical rests of skin after elective surgeries. The bioplates were procured meeting all aseptic rules. Under sterile conditions the bioplates were finely grained with the sizes of the pieces of 0.1×0.1 cm and placed into corresponding media: Hanks solution; medium 199 with 10% donor's blood serum; donor's blood serum. Bioplates in the mentioned media were stored at 4°C.

The bioplates were removed out of the storage media every 7 days, small fragments were placed into Petri dish, added with medium 199 with 10% fetal serum (“Biolut”, Russia) and incubated in CO<sub>2</sub> incubator.

Disintegrated skin bioplates were placed into cryovials (Nunc). For cryopreservation the following media were used: fetal serum, the one with 10% DMSO and medium 199. During freezing with 10% DMSO the bioplate was slowly placed into the serum

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Измельченные кожные биоптаты помещали в криопробирки фирмы "Nunc". Для консервирования применяли следующие среды: эмбриональную сыворотку, эмбриональную сыворотку с 10% ДМСО, среду 199. При замораживании с 10% ДМСО биоптат помещали в сыворотку и медленно (в течение 7–10 мин) по каплям добавляли равный объем 20% ДМСО, приготовленного на сыворотке. После 15-минутной эквилибрации образцы замораживали на программном замораживателе со скоростью охлаждения 1°C/мин до –70°C с последующим погружением в жидкий азот.

Культуры фибробластов получали из нативных образцов биоптатов по стандартным протоколам. Клетки культивировали на среде 199 с добавлением 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Для криоконсервирования и гипотермического хранения фибробласты переводили в суспензионное состояние. Суспензию клеток в растворе Хенкса с концентрацией  $1 \times 10^6$  кл/мл хранили при 4°C или замораживали в сыворотке без криопротектора и в сыворотке с 10% ДМСО. Образцы охлаждали со скоростью 1°C/мин до –70°C и погружали в жидкий азот.

После гипотермического хранения каждые 24 ч подсчитывали клетки. После чего суспензию переносили в ростовую среду и высевали в концентрации 20000 кл/см<sup>2</sup> в культуральные матрасы. Пролиферативную активность клеток оценивали визуально в инвертированном микроскопе, фиксируя момент формирования монослоя.

### Результаты и обсуждение

Установлено, что в контроле выселение фибробластов по периферии нативных эксплантатов начиналось на 7–11 сутки с формированием небольших участков монослоя в последующие 4–5 сутки (рисунок).

Установлено, что гипотермическое хранение обеспечивало сохранность биоптатов в течение 14 суток (срок наблюдения), при этом способность к образованию фибробластов зависела от среды хранения. После хранения в течение 7 суток в сыворотке выселение фибробластов начиналось на 7–11 сутки, а в растворе Хенкса – на 9–12 сутки. После 14 суток хранения биоптатов в растворе Хенкса первые фибробласты появлялись на 14–15 сутки, однако они обладали слабой адгезией и расплыванием. Из биоптатов, хранившихся в сыворотке, фибробласты появлялись на 16–18 сутки, а участки монослоя формировались на 23–25 сутки. При хранении в течение 7–14 суток в среде 199 с 10% сыворотки выход фибробластов не наблюдали.

При культивировании биоптатов, замороженных в сыворотке, фибробласты не выселялись, что свидетельствует о гибели клеточных элементов био-

(for 7–10 min) and an equal volume of 20% DMSO prepared with serum was dropwise added. After 15 mins' equilibration the samples were frozen by means of programmable freezer with cooling rate of 1°C/min down to –70°C with following plunging into liquid nitrogen.

The fibroblast cultures were obtained from native samples of bioplates according to the standard protocols. The cells were cultured with the medium 199 and 5% fetal bovine serum. For cryopreservation and hypothermic storage the fibroblasts were transferred into suspensions. Cell suspension in Hanks solution with the concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml was stored at 4°C or frozen in serum with no cryoprotectant as well as in serum with 10% DMSO. The samples were cooled with the rate of 1°C/min down to –70°C and plunged into liquid nitrogen.

After hypothermic storage every 24 hrs the cells were counted. Afterwards the suspension was transferred into growth culture and inoculated in the concentration of 20,000 cells/cm<sup>2</sup> into cultural matras- ses. Proliferative activity of cells was evaluated visually with inverted microscope by means of fixing the moment of monolayer formation.

### Results and discussion

It has been established that in the control the settling of fibroblasts on periphery of native explants started to the 7–11 days with the formation of small sites of monolayer during the following 4–5 days (figure).

It has been established that hypothermic storage provides the survival of bioplates for 14 days (observation term), herewith the ability to form fibroblasts depended on storage medium. After storage for 7 days in serum the settling of fibroblasts started at 7–11 days and in Hanks solution to the 9–12<sup>th</sup> days. After storage of bioplates in Hanks solution for 14 days the first fibroblasts appeared to the 14–15 days, however they had a weak adhesion and flattening. From bioplates stored in serum the fibroblasts appeared to the 16–18<sup>th</sup> days and the sites of monolayer were formed to the 23–25<sup>th</sup> days. During storage for 7–14 days in medium 199 with 10% serum the yield of fibroblasts was not observed.

When culturing the bioplates frozen in serum the fibroblasts were not settled, that testified to the death of cell elements of bioplates. During freezing in serum with 10% DMSO there were observed the settling of fibroblasts to the 9–13 days. The change in the character of fibroblast settling-out from cryopreserved explants if compared to native samples was noted. To the 9–13<sup>th</sup> days around the explant multiple roundish cells, weakly adhered to substrate, appear. Only in a small part of cells (about 20–30%) the tendency to flattening was found. The cells had spindle-like shape, their size was less than native fibroblasts had and they had no elongated lamellopodias. During observation

птата. При замораживании в сыворотке с 10% ДМСО наблюдали выселение фибробластов на 9–13 сутки. Отмечено изменение характера выселения фибробластов из криоконсервированных эксплантатов по сравнению с нативными образцами. На 9–13 сутки вокруг эксплантата появлялось множество округлых клеток, слабо адгезированных к субстрату. Лишь у небольшой части клеток (около 20–30%) отмечена тенденция к расплыванию. Клетки имели веретенообразную форму, их размер был меньше, чем нативных фибробластов, и они не имели вытянутых ламеллоподий. При наблюдении в течение последующих 7 суток установлено, что количество прикрепившихся и распластанных клеток не увеличивалось. Тенденция к росту прикрепившихся клеток не отмечена, вследствие чего неприкрепившиеся клетки погибли.

Для активизации пролиферации фибробластов, полученных из криоконсервированных эксплантатов, добавляли ростовые факторы.

Установлено, что при гипотермическом хранении суспензии фибробластов в первые 24 ч погибло 12,6% клеток, через 48 ч их сохранность снижалась до 73,4%. Клетки после гипотермического хранения в указанные сроки сохраняли пролиферативную активность, но при последующем культивировании монослой формировался в более поздние сроки, чем у нативных клеток. В результате гипотермического хранения в течение 72 ч количество сохранных клеток составляло 30,1%. При последующем культивировании клетки пролиферировали, но монослой не формировался.

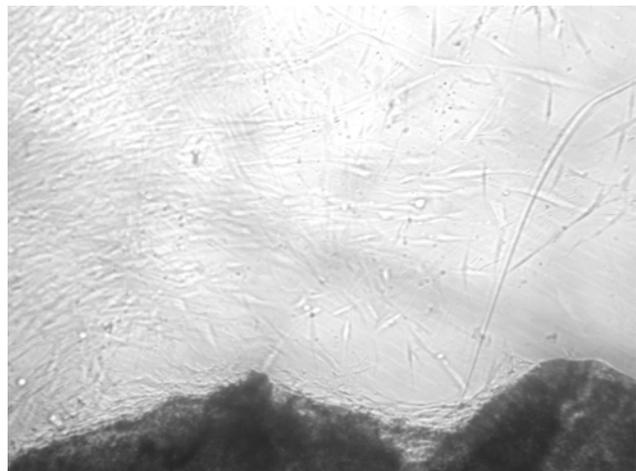
### Выводы

После криоконсервирования суспензии фибробластов в эмбриональной сыворотке и эмбриональной сыворотке с 10% ДМСО количество жизнеспособных клеток составляло 66,4 и 84,7% соответственно, что на 31,4 и 13,1% меньше, чем в суспензии незамороженных клеток. При культивировании клетки сохраняли пролиферативные свойства, несколько отличные от нативных, что выражалось в запаздывании формирования монослоя на 2–3 суток.

*Авторы выражают благодарность ст. н. с. отдела КСР ИПКиК НАН Украины Гончарук Е.И. за оказанную помощь при выполнении данной работы.*

### Литература

1. Бобро Л.И. Фибробласты и их значение в тканевых реакциях // Архив патологии.– 1990.– Т. 52, №12.– С. 65–68.
2. Жилина Н.М., Иванова В.Б., Корень Н.Н. и др. Сравнительный анализ кожной аутопластики традиционными методами и с использованием клеточной культуры



Участки монослоя нативных эксплантатов на 15 сутки культивирования.

Monolayer sites of native explants to the 15<sup>th</sup> day of culturing.

within the following 7 days it has been shown that the number of adhered and flattened cells did not increase. The tendency to the growth of adhered cells was not observed, due to at the non-adhered cells died.

For activation of proliferation of fibroblasts derived from cryopreserved explants the growth factors were added.

It has been established that during hypothermic storage of fibroblast suspension during the first 24 hrs 12.6% of cells dies, in 48 hrs their survival reduced to 73.4%. The cells after hypothermic storage within the mentioned terms kept proliferative activity, but during following culturing but the monolayer was formed in later terms than in native cells. In the result of hypothermic storage for 72 hrs the number of survived cells made 30.1%. During following culturing the cells proliferated but no monolayer was formed.

### Conclusions

After cryopreservation of the suspension of fibroblasts in fetal serum and in that with 10% DMSO the number of viable cells made 66.4 and 84.7%, correspondingly, that is by 31.4 and 13.1% less than in the suspension of non-frozen cells. During culturing the cells preserved proliferative properties, slightly different from native ones, that was manifested in delaying of the formation of monolayer by 2–3 days.

*The authors acknowledge Dr. E. I. Goncharuk, senior scientist of the Department of Cryobiology of Reproductive Systems at IPC&C, for the assistance rendered.*

### References

1. Bobro L.I. Fibroblasts and their significance in tissue reactions // Arkh. Patol.– 1990.– Vol. 52, N12.– P. 65-68.
2. Zhilina N.M., Ivanova V.B., Koren N.N. et al. Comparative analysis of skin autoplastics with traditional methods as well

фибробластов // Вестник новых медицинских технологий.– 1997.– Т. 4, №1–2.– С. 5–68.

3. *Киреева Н.Б., Хафизова Л.А., Паршиков В.В. и др.* Эндоскопическая коррекция пузырно-мочеточникового рефлюкса у детей с использованием ауто- или аллофибробластов // Нижегородский медицинский журнал.– 2003.– № 3–4.– С. 8–12.

as using cell culture of fibroblasts // Buletен novykh medinskikh tekhnologiy.– 1997.– Vol. 4, N1-2.– P. 5–68.

3. *Kireyeva N.B., Khafizova L.A., Parshikov V.V. et al.* Endoscopic correction of vesicoureteral reflux in children using auto- or allofibroblasts // Nizhegorodskiy Med. Zhurn.– 2003.– N3.– P. 8–12.

*Поступила 06.05.2008*

*Accepted in 06.05.2008*