

# Д.Н.Тарусин\*, Ю.А. Петренко, О.А. Семенченко, В.В. Муценко, В.С. Зайков, А.Ю.Петренко

## Эффективность сахарозо-содержащего раствора и раствора UW для гипотермического хранения мезенхимальных стромальных клеток человека в суспензии или в составе альгинатных микросфер

UDC 612.592:611.018.2/6:664.644.7

### D.N. Tarusin\*, Yu.A. Petrenko, O.A. Semenchenko, V.V. Mutsenko, V.S. Zaikov, A.Yu. Petrenko

## Efficiency of The Sucrose-Based Solution and UW Solution for Hypothermic Storage of Human Mesenchymal Stromal Cells in Suspension or Within Alginate Microspheres

**Реферат:** Исследовали влияние гипотермического хранения (ГХ) на жизнеспособность и функциональную активность мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека в суспензии и альгинатных микросферах (АМС). Клетки хранили в герметически закрытых криопробирках при 4°C в культуральной среде (КС), сахарозо-содержащем растворе (ССР) и растворе Университета Висконсина (UW). Через 3 и 7 суток хранения жизнеспособность, метаболическую активность и морфофункциональное состояние МСК оценивали по МТТ-, Alamar Blue-тестам, адгезивной активности, морфологии и способности к мультилинейной дифференцировке в условиях монослойного культивирования. Установлено, что ГХ суспензии МСК в КС в течение 3-х суток приводит к 3–4-кратному снижению их жизнеспособности и способности к адгезии. Инкапсуляция в АМС частично предотвращает гибель клеток. Гипотермическое хранение в течение 7 суток вызывает гибель практически всех МСК как в суспензии, так и в АМС. При замене КС на консервирующий раствор UW и ССР сохраняются жизнеспособность и метаболическая активность МСК при ГХ в течение 3-х суток как в суспензии, так и в составе АМС. После 7 суток ГХ в растворе UW и ССР МСК в суспензии и АМС сохраняют жизнеспособность на уровне 60–80%, адгезивные свойства, метаболическую активность, а также способность к индуцированной адипо- и остеогенной дифференцировке. Использование консервирующего раствора UW и ССР позволяет продлить сроки гипотермического хранения МСК.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стромальные клетки, альгинатные микросферы, гипотермическое хранение, консервирующие растворы, культивирование, адгезия, метаболическая активность, индуцированная дифференцировка.

**Реферат:** Досліджували вплив гіпотермічного зберігання (ГЗ) на життєздатність та функціональну активність мезенхімальних стромальних клітин (МСК) людини в суспензії та альгінатних микросферах (АМС). Клітини зберігали в герметично закритих криопробірках за 4°C у культуральному середовищі (КС), сахарозо-вмісному розчині (СВР) та розчині Університету Вісконсину (UW). Через 3 і 7 днів зберігання життєздатність, метаболічну активність та морфофункціональний стан МСК оцінювали за МТТ-, Alamar Blue-тестами, адгезивною активністю, морфологією і здатністю до мультилінійного диференціювання в умовах монослоєвого культивування. Встановлено, що ГЗ суспензії МСК у КС протягом 3-х днів призводить до 3–4-кратного зниження їх життєздатності та здатності до адгезії. Інкапсуляція в АМС частково запобігає загибелі клітин. Гіпотермічне зберігання протягом 7 днів викликає загибель практично всіх МСК як у суспензії, так і в АМС. Заміна КС на консервуючий розчин UW і СВР запобігає зниженню життєздатності та метаболічної активності МСК при ГЗ протягом 3-х днів як в суспензії, так і складі АМС. Після 7 днів ГЗ у розчині UW і СВР МСК у суспензії та АМС зберігають життєздатність на рівні 60–80%, адгезивні властивості, метаболічну активність, а також здатність до індукованого адіпо- та остеогенного диференціювання. Використання консервуючого розчину UW і СВР дозволяє подовжити термін гіпотермічного зберігання МСК.

**Ключові слова:** мезенхімальні стромальні клітини, альгінатні микросфери, гіпотермічне зберігання, консервуючі розчини, культивування, адгезія, метаболічна активність, індуковане диференціювання.

**Abstract:** The effect of hypothermic storage (HS) on viability and functional activity of human mesenchymal stromal cells (MSCs) in suspension and within alginate microspheres (AMs) was studied. Cells were stored in sealed cryovials at 4°C in culture medium (CM), sucrose-based solution (SBS) and that of the University of Wisconsin (UW). After 3 and 7 days of storage the viability, metabolic activity and morphology of MSCs were assessed by MTT-assay, Alamar Blue test, adhesive activity, morphology and ability of multilineage differentiation at monolayer culture conditions. Hypothermic storage of MSCs suspension in CM for 3 days was established to result in a 3–4-fold decrease in their viability and adhesive ability. The encapsulation into AMs partially prevented cell death. Hypothermic storage for 7 days caused death of almost all MSCs both in suspension and AMs. The substitution of CM for UW and SBS preservation solutions maintained the MSCs viability and metabolic activity following HS within 3 days both in suspension and within AMs. After 7 days of HS in UW and SBS solutions the MSCs in suspensions and within AMs preserved their viability on the level of 60–80%, adhesive properties, metabolic activity, as well as the ability for induced adipogenic and osteogenic differentiation. The use of UW and SBS preservation solutions enabled to prolong the hypothermic storage terms for MSCs.

**Key words:** mesenchymal stromal cells, alginate microspheres, hypothermic storage, preservation solution, culture, adhesion, metabolic activity, induced differentiation.

Отдел криобиохимии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;  
тел.: (+38 057) 373-41-43, факс: (+38 057) 373-30-84,  
электронная почта: tarusindmitriy@gmail.com

Поступила 21.08.2015  
Принята в печать 28.09.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 329–339.  
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryobiochemistry, 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 61016;  
tel.: +380 57 373 4143, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: tarusindmitriy@gmail.com

Received August, 21, 2015  
Accepted September, 28, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(4): 329–339.  
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Интерес исследователей к использованию в регенеративной медицине и тканевой инженерии мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека можно объяснить их уникальными дифференцировочными и терапевтическими свойствами [1, 2, 7, 17]. Заключение МСК в альгинатные микросферы (АМС) позволяет нивелировать нежелательный иммунный ответ после трансплантации, контролировать доставку клеточного материала, получать пролонгированный терапевтический эффект [4]. При этом поступление в клетки питательных веществ и кислорода, необходимых для их функционирования, не нарушается. Для изучения свойств и практического применения МСК в составе АМС необходимо создание достаточного их запаса. С целью долгосрочного хранения биоматериала, как правило, применяют дорогостоящие и затратные по времени методы криоконсервирования, предполагающие пребывание образцов в низкотемпературном банке [3, 5]. Используемые протоколы должны обеспечивать сохранность морфофункциональных свойств клеток и структурную целостность носителя. Альтернативой хранению в замороженном виде может быть гипотермическое хранение (ГХ) при низких положительных температурах (0...4°C). Однако до настоящего времени существуют только единичные публикации, посвященные исследованию эффективности гипотермического хранения МСК в составе АМС.

Целью работы явилось изучение влияния гипотермического хранения в различных средах на жизнеспособность, метаболическую активность и дифференцировочный потенциал МСК, находящихся в виде суспензии или инкапсулированных в альгинатные микросферы.

В работе использовали два консервирующих раствора, которые приведены в таблице. Эти растворы положительно зарекомендовали себя при гипотермическом хранении разных типов клеток и органов [6, 13, 14]:

1. Раствор, основными компонентами которого являются лактобионат и раффиноза, разработан исследователями из Университета Висконсина (UW). Данный раствор нашел широкое применение для гипотермического хранения разных органов и типов клеток [15, 16].

2. Разработанный в отделе криобиохимии ИПКиК НАН Украины оригинальный сахарозо-содержащий раствор (ССР), приготовленный на основе фосфатного буфера и содержащий полиэтиленгликоль-8000 (ПЭГ-8000), позволяет предотвращать осмотические повреждения, индуцированные холодной ишемией, и сохранять метаболические характеристики биологических объектов [8].

The interest of scholars for the application of human mesenchymal stromal cells (MSCs) in regenerative medicine and tissue engineering may be explained by their unique differentiation and therapeutic properties [4, 5, 13, 17]. The encapsulation of MSCs into alginate microspheres (AMSs) enables to balance undesirable immune response occurring post transplantation, to control cell-based product delivery, and obtain a prolonged therapeutic effect [9]. There is no dearrangement observed in entering of essential nutrients and oxygen into cells. Investigation of the properties and practical application of MSCs encapsulated within the AMSs requires a sufficient stock of them. For the purpose of long-term storage of biological material, one usually applies the expensive and time consuming cryopreservation methods, suggesting low temperature banking of the samples [7, 10]. The used protocols should ensure the preservation of morphofunctional properties of cells and structural integrity of carrier. Hypothermic storage (HS) at low positive temperatures (0...4°C) may be an alternative to the storing in a frozen state. However, to date there are only few publications on studying the efficiency of MSCs hypothermic storage within the AMSs.

This research was aimed to study the effect of hypothermic storage in different media on the viability, metabolic activity and differentiation potential of MSCs in suspension or encapsulated into alginate microspheres.

We used two preservation solutions shown in Table. These solutions demonstrated good result during hypothermic storage of different cells and organs [11, 12, 14]:

1. The solution, whose main components were lactobionate and raffinose, was designed by scientists from the University of Wisconsin (UW). This solution has been widely used for hypothermic storage of different organs and cell types [15, 16].

2. The original sucrose-based solution (SBS), designed at the Cryobiochemistry Department of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, based on phosphate buffer and polyethylene glycol-8000 (PEG-8000), it enables preventing cold ischemia-induced osmotic damages, and preserving metabolic characteristics of biological objects [6].

### Materials and methods

Experiments were performed in human adult dermal MSCs, procured in accordance with the recommendations of the WMA Association of Helsinki, and the requirements of Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine. The cells were isolated by explantation of skin pieces [2]. The monolayer was cultured



## Материалы и методы

Эксперименты проводили на МСК дермы взрослого человека, которые были получены в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации Всемирной ассоциации по проведению биомедицинских исследований и требованиями биоэтического комитета ИПКиК НАН Украины. Клетки выделяли методом эксплантации кусочков кожи [10]. Монослойное культивирование проводили в культуральной среде (КС)  $\alpha$ -МЕМ («РАА», Австрия), дополненной 10%-й эмбриональной сывороткой (ЭС) крупного рогатого скота, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина, во флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Среду меняли каждые 3–4 суток. При достижении клетками 70%-го монослоя его пассировали по стандартной методике с использованием смеси трипсин/версен в соотношении 1:4 и высевали с коэффициентом пересева 1:3 [11]. Для исследований использовали культуры МСК 4–8-го пассажей. Клетки снимали, как описано выше, осаждали путем центрифугирования при 150g в течение 7 мин (во всех последующих процедурах параметры центрифугирования были такие же), промывали раствором, содержащим 0,15 М NaCl и 25 мМ HEPES при pH 7,4 (далее в тексте – промывочный раствор), и затем суспендировали в культуральной среде.

Суспензия была разделена на две равные части: одну – инкапсулировали в АМС, другая оставалась в виде суспензии. Для инкапсуляции клетки суспендировали в очищенном 1,2%-м растворе альгината натрия («Sigma-Aldrich», США), приготовленном на растворе Хенкса (pH 7,4). Суспензию клеток помещали в стерильный шприц объемом 1 мл с диаметром иглы 0,33 мм и по капле вносили в раствор 2%-го CaCl<sub>2</sub>, в котором оставляли на 10 мин для полимеризации. После этого проводили ступенчатую отмывку от избытка ионов кальция промывочным раствором. Полученные таким образом АМС, содержащие МСК, на сутки помещали в описанные выше условия культивирования. Диаметр АМС составлял (2 ± 0,1) мм.

Мезенхимальные стромальные клетки в суспензии и АМС вносили в криопробирки («Nunc», США), содержащие по 1 мл ССР, UW или КС. Герметично закрытые криопробирки с исследуемыми образцами помещали в бытовой холодильник (4°C) для гипотермического хранения в течение 7 суток.

На 3- и 7-е сутки гипотермического хранения АМС растворяли путем добавления 1 мл 50 мМ цитрата натрия. Полученную суспензию МСК отмывали промывочным раствором и суспендировали в 1 мл культуральной среды. Клетки, храня-

Состав консервирующих растворов, используемых для гипотермического хранения МСК в суспензии и АМС

Composition of preservation solutions used for hypothermic storage of MSCs in suspension and AMSs

Компоненты Components	Концентрация компонентов в консервирующих растворах, ммоль/л Concentration of components in preservation medium, mmol/l		
	$\alpha$ -МЕМ (основные компоненты/ main components)	UW	ССР SBS
NaCl	116,3	–	–
КОН	–	105	–
NaOH	–	4	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	2,6	30
MgSO <sub>4</sub>	0,8	10	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	–	15
CaCl <sub>2</sub>	1,8	–	0,5
Лактобионовая кислота Lactobionic acid	–	108	–
L-Глутамин L-Glutamine	2	–	–
D-Глюкоза D-Glucose	5,5	–	–
Рафиноза Raffinose	–	31	–
Сахароза Sucrose	–	–	250
ПЭГ-8000 PEG-8000	–	–	1%
pH	7,4	7,4	7,4

in the culture medium (CM) of  $\alpha$ -MEM (PAA, Austria) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 IU/ml of penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin, in 75 cm<sup>2</sup> vials at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. The medium was changed every 3–4 days. When the cells reached a 70% monolayer, they were then passaged by the standard technique using Trypsin/Versene mixture at 1:4 ratio and plated with 1:3 re-seeding coefficient [3]. The MSCs cultures which underwent 4–8 passages were used for study. Cells were detached as described above, precipitated by centrifugation at 150g for 7 min (in all further procedures the centrifugation parameters were the same), washed with the solution containing 0.15 M NaCl and



щиеся в виде суспензии, также отмывали от консервирующих растворов аналогичным образом. В качестве контроля (нулевая точка хранения) были использованы МСК, находящиеся в виде суспензии или инкапсулированные в АМС, до гипотермического хранения.

Жизнеспособность МСК оценивали с помощью МТТ-теста. К 0,5 мл суспензии клеток добавляли 50 мкл редокс-индикатора МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия) бромида («Sigma-Aldrich») в концентрации 5 мг/мл. После 2 ч инкубации при температуре 37°C образцы центрифугировали, осадок суспендировали в физиологическом растворе и подсчитывали количество клеток в камере Горяева согласно стандартной методике [9]. Жизнеспособность определяли как отношение количества МСК, накопивших формазан, к общему количеству клеток и выражали в процентах.

Клеточную адгезию оценивали по способности МСК прикрепляться на пластик после суток культивирования. Для этого отбирали весь объем культуральной среды (0,5 мл) и подсчитывали в ней количество не адгезировавших клеток. Коэффициент клеточной адгезии рассчитывали по формуле:  $E = (A - B/A) \times 100 \%$ , где  $A$  – количество клеток до посева (по МТТ-тесту),  $B$  – количество неприкрепившихся клеток.

Метаболическую активность МСК оценивали по интенсивности флуоресценции восстановленной формы редокс-индикатора Alamar Blue (AB, «Serotec», США). Для этого суспензию клеток помещали в лунки культурального планшета и культивировали в течение суток. После чего добавляли по 0,5 мл свежей среды, содержащей 10% АВ. Флуоресценцию восстановленной формы АВ определяли после 2 ч инкубации при 37°C (5% CO<sub>2</sub>) на спектрофлуориметре («Tecan GENios», Австралия) при длине волны возбуждения 550 нм, эмиссии – 590 нм. Полученные таким образом данные обрабатывали с помощью программы «XFLUOR4 v/4/50» («Tecan GENios»). Результаты представляли как различия между значением флуоресценции опытной и холостой проб (10%-й раствор АВ) и выражали в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ).

Адипогенную дифференцировку МСК индуцировали на протяжении 21 суток культивирования в среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 10% ЭС; 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина («Sigma-Aldrich»); 1 мкМ дексаметазона («Sigma-Aldrich»); 10 мкг/мл инсулина («Sigma-Aldrich»); 100 мкМ индометацина («Sigma-Aldrich»). Замену сред проводили два раза в неделю. После этого клеточные культуры фиксировали 10%-м формалином, приготовленным на растворе Хенкса, в течение 30 мин при 4°C. Для

25 mM HEPES at pH 7.4 (hereinafter washing solution), and then suspended in culture medium.

We divided the suspension into two equal portions: one was encapsulated into AMSs, another remained as a suspension. For encapsulation the cells were suspended in purified 1.2% sodium alginate solution (Sigma-Aldrich, USA), prepared with Hanks' solution (pH 7.4). Cell suspension was then placed into a sterile 1 ml syringe with 0.33 mm needle diameter and added dropwise into 2% CaCl<sub>2</sub> solution, where it was left for 10 min to polymerize. Afterwards a stepwise washing out of surplus calcium ions by means of washing solution was done. The obtained AMSs, containing MSCs were placed for 24 hrs under described above culture conditions. The AMSs diameter made ( $2 \pm 0.1$ ) mm.

Mesenchymal stromal cells in suspension and within AMSs were placed into cryovials (Nunc, USA), filled with 1 ml of SBS, UW or CM. The sealed cryovials with the studied specimens were placed into domestic refrigerator (4°C) for hypothermic storage within 7 days.

To days 3 and 7 of hypothermic storage the AMSs were dissolved by adding 1 ml of 50 mM sodium citrate. The obtained suspension of MSCs was washed with washing solution and suspended in 1 ml of culture medium. Cells stored as a suspension were also similarly washed of preservation solutions. As the control (zero time point of storage) we used the data from MSCs in suspension or encapsulated in AMSs assessed prior to hypothermic storage.

The MSCs viability was assessed by MTT test. The 0.5 ml cell suspension was supplemented with 50  $\mu$ l of redox indicator MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium) bromide (Sigma-Aldrich) in 5 mg/ml concentration. After 2 hrs' incubation at 37°C the samples were centrifuged, the sediment was suspended in saline and a number of cells was calculated in Goryaev's chamber according to the standard technique [1]. The viability was determined as the ratio of MSCs accumulated formazan to the total number of cells and expressed as a percentage.

Cell adhesion was assessed by the ability of MSCs to adhere to plastic after 24 hrs of culture. For this purpose we collected the whole volume of culture medium (0.5 ml) and counted a number of not adhered cells. The coefficient of cell adhesion was calculated by the following formula:  $E = (A - B/A) \times 100 \%$ , where  $A$  was a number of cells before plating (by MTT assay);  $B$  was a number of not adhered cells.

Metabolic activity of MSCs was evaluated by fluorescence intensity of reduced form of redox indicator Alamar Blue (AB, Serotec, USA). For this purpose we placed a cell suspension into wells of culture plate and cultured for 24 hrs. Then 0.5 ml of fresh medium containing 10% AB was added. The fluorescence of



учета спонтанной дифференцировки клетки культивировали в среде  $\alpha$ -MEM с 10% ЭС без индукторов. Для подтверждения адипогенной дифференцировки МСК выявляли нейтральные липиды методом окрашивания Oil Red O («Sigma-Aldrich»). Фиксированные препараты культур клеток промывали 60%-м изопропиловым спиртом («Макрохим», Россия) и выдерживали в свежеприготовленном растворе Oil Red O (30 мг/мл в 60%-м изопропанол) в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего промывали дистиллированной водой [15].

Остеогенную дифференцировку МСК индуцировали при культивировании в среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 10% ЭС, 100 нМ дексаметазона («Sigma-Aldrich»), 10 мМ  $\alpha$ -глицерофосфата («Sigma-Aldrich»), 0,2 мМ L-аскорбиновой кислоты-2-фосфата («Sigma-Aldrich») в течение 21 суток. Подтверждением дифференцировки клеток в данном направлении считали накопление внеклеточного кальция, которое оценивали морфологически по окрашиванию проб по методу Даля [12]. Для этого фиксированные препараты культур МСК инкубировали в течение 2 мин в 1%-м растворе красителя Alizarin Red S («Sigma-Aldrich») при комнатной температуре, затем тщательно промывали дистиллированной водой.

Для морфологических исследований использовали световой инвертированный микроскоп «CETI Inverso» («CETI», Бельгия).

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программ «Excel» («Microsoft», США) и «Past Statistic v/3/01» (Швеция). В зависимости от характера распределения данных значимость различий между показателями оценивали, используя параметрический t-критерий Стьюдента или непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия между выборками считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Исходная жизнеспособность МСК дермы человека составляла  $(96 \pm 3)\%$ . Инкапсуляция МСК в АМС не приводила к значимому изменению этого показателя.

Эффективность UW и ССР при гипотермическом хранении МСК в виде суспензии и после заключения в АМС оценивали по их жизнеспособности, определяемой с помощью МТТ-теста. Как показали результаты исследований, хранение суспензии клеток в КС приводило к снижению жизнеспособности до  $(33 \pm 10)\%$  уже на 3-и сутки (рис. 1). Инкапсуляция в альгинатные микросферы частично предотвращала гибель клеток: жизнеспособность составляла  $(51 \pm 9)\%$ . Использование

reduced form of AB was determined after 2 hrs incubation at 37°C (5% CO<sub>2</sub>) with spectrofluorimeter (Tecan GENios, Australia) at 550 nm excitation and 590 nm emission wavelengths.

The data were processed using XFLUOR4 v/4/50 software (Tecan GENios). Results were presented as differences between fluorescence value of experimental and blank samples (10% solution AB) and expressed in relative fluorescence units (RFU).

Adipogenic differentiation of MSCs was induced within 21 days of culture in  $\alpha$ -MEM medium, containing 10% FBS; 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich); 1  $\mu$ M dexamethasone (Sigma-Aldrich); 10  $\mu$ g/ml insulin (Sigma-Aldrich); 100  $\mu$ M indomethacin (Sigma-Aldrich). Media were changed twice a week. Afterwards the cell cultures were fixed by 10% formalin in Hanks solution, for 30 min at 4°C. To consider a spontaneous differentiation the cells were cultured in  $\alpha$ -MEM with 10% FBS without inducers. To confirm adipogenic differentiation of MSCs the neutral lipids were stained by Oil Red O (Sigma-Aldrich). Fixed preparations of cell cultures were washed with 60% isopropyl alcohol (Macrochem, Russia) and kept in a freshly prepared solution of Oil Red O (30 mg/ml in 60% isopropanol) for 1 h at room temperature, then washed with distilled water [15].

Osteogenic differentiation of MSCs was induced following culture in  $\alpha$ -MEM medium, containing 10% FBS, 100 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 10 mM  $\alpha$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich), 0.2 mM L-ascorbic acid-2-phosphate (Sigma-Aldrich) for 21 days. Accumulation of extracellular calcium, assessed morphologically by sample staining using Dahl method, was considered as the confirmation of cell differentiation in this direction [8]. For this aim the fixed preparations of MSC cultures were incubated for 2 min in 1% Alizarin Red S dye (Sigma-Aldrich) at room temperature, then thoroughly washed with distilled water.

For morphological studies we used CETI Inverso light inverted microscope (CETI, Belgium).

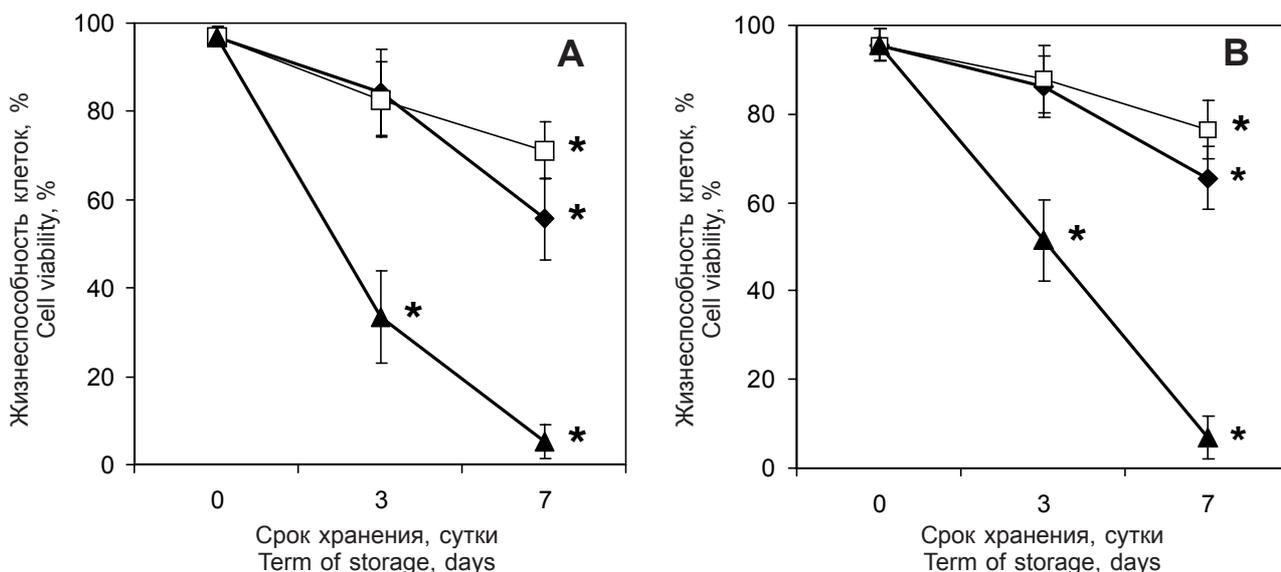
Our findings were statistically processed using Excel (Microsoft, USA) and Past Statistic v/3/01 software (Sweden). Depending on the pattern of data distribution the significance of differences between indices was evaluated using either a parametric Student's t-test or nonparametric Mann-Whitney test. Differences between samples were considered as significant at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

Initial viability of human dermal MSCs made  $(96 \pm 3)\%$ . The encapsulation of MSCs into AMSs did not significant change this index.

The efficiency of UW and SBS during MSCs hypothermic storage in suspension and after encapsu-





**Рис. 1.** Жизнеспособность суспензии (А) и заключенных в АМС (В) МСК, хранившихся в ССР (◆), UW (□) и КС (▲) по МТТ-тесту; \* – различия значимы по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Viability of MSCs, stored as suspension (А) or within AMSs (В) in SBS (◆), UW (□) or CM (▲); MTT assay; \* – differences are statistically significant as compared to the control,  $p < 0.05$ .

в качестве сред хранения растворов UW и ССР позволяло сохранить жизнеспособность практически на контрольном уровне.

Гипотермическое хранение в КС в течение 7 суток вызывало гибель практически всех МСК как в суспензии, так и в АМС. В то же время после этого срока хранения в ССР или UW жизнеспособность МСК как в суспензии, так и в составе АМС, хоть и значительно снижалась, но оставалась в пределах от  $(56 \pm 9)$  до  $(76 \pm 6)\%$ .

Аналогичные данные были получены при оценке адгезивной способности МСК, хранившихся в суспензии и АМС (рис. 2). После 3-х суток гипотермического хранения в КС только  $(27 \pm 10)\%$  клеток адгезировали на поверхности культурального пластика. В образцах с консервирующими растворами наблюдалась тенденция к снижению изучаемого показателя, однако значимых различий по сравнению с контрольным уровнем обнаружено не было. После 7-ми суток ГХ клетки сохраняли высокую способность адгезировать на культуральный пластик независимо от применяемой консервирующей среды и формы хранения. Процент клеток, способных к адгезии, после хранения в ССР или UW составлял от  $(53 \pm 10)$  до  $(73 \pm 11)\%$  клеток. В то же время хранение в культуральной среде в течение 7 суток приводило к практически полному отсутствию адгезировавших клеток.

Проведенные морфологические исследования позволили установить, что МСК, хранившиеся в ССР или UW в течение 3-х или 7-ми суток, как в виде суспензии, так и в составе АМС, в условиях

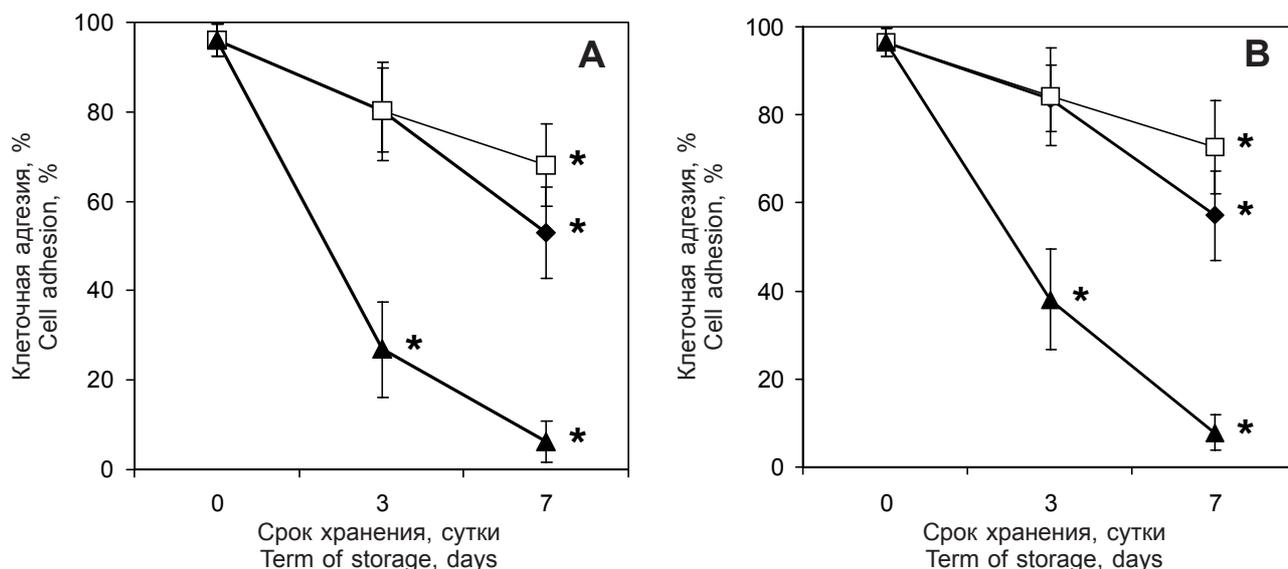
латации into AMSs was assessed by their viability, determined with MTT assay. As could be seen, the storage of cell suspension in CM reduced the viability down to  $(33 \pm 10)\%$  even to day 3 (Fig. 1). The encapsulation into alginate microspheres partially prevented cell death: viability made  $(51 \pm 9)\%$ . The use of UW and SBS solutions as storage media enabled preserving the viability almost at the control level.

Hypothermic storage in CM for 7 days caused a death of almost all MSCs both in suspension and within AMSs. Storage in SBS and UW till this time point resulted in a significant decrease of MSCs viability both in suspension and within AMSs, however remained within the admissible limits from  $(56 \pm 9)$  to  $(76 \pm 6)\%$ .

Similar data were obtained when assessing an adhesive ability of MSCs, stored in suspension and within AMSs (Fig. 2). After 3 days of hypothermic storage in CM only  $(27 \pm 10)\%$  of cells adhered to culture plastic surface. In the samples with preservation solutions we observed the tendency to a decrease in the studied index, but no significant differences as compared to the control levels were revealed. After 7 days of hypothermic storage cells kept a high ability to adhere to culture plastic independently on the applied preservation medium and storage form. The percentage of cells capable of adhesion after storage in UW and SBS made from  $(53 \pm 10)$  to  $(73 \pm 11)\%$  of cells. At the same time the storage in culture medium for 7 days resulted in quite complete absence of adhered cells.

Implemented morphological studies enabled revealing the fact that MSCs, stored in SBS and UW for 3





**Рис. 2.** Уровень адгезии суспензии (А) и заключенных в АМС (В) МСК, хранившихся в ССР (◆), UW (□) и КС (▲); \* – различия значимы по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Adhesion level of MSCs, stored as suspension (А) or within AMSs (В) in SBS (◆), UW (□) or CM (▲); \* – differences are statistically significant as compared to the control,  $p < 0.05$ .

монослойного культивирования активно пролиферировали, что свидетельствует о сохранении их функциональной полноценности (рис. 3).

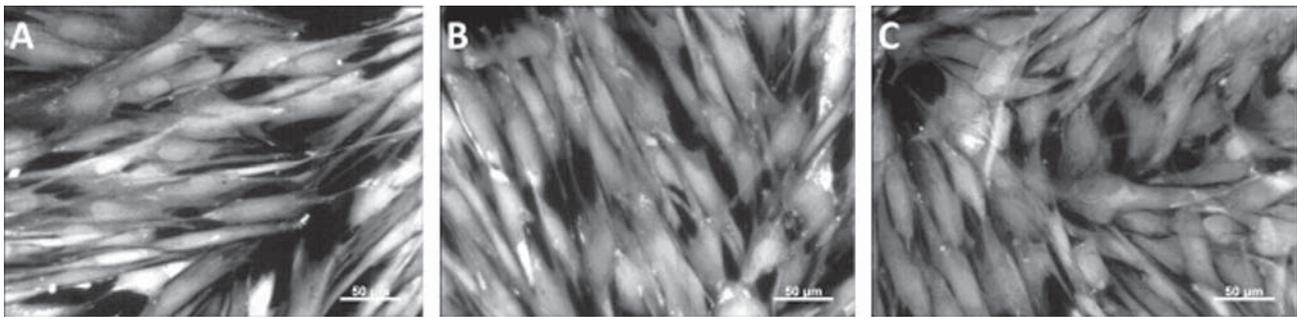
Объективным показателем метаболической и пролиферативной активности клеток может служить АВ-тест. На рис. 4 представлены данные о способности клеток, хранившихся в суспензии и АМС, восстанавливать АВ через 1 и 7 суток монослойного культивирования. Видно, что через 1 сутки культивирования клеток, предварительно подвергнутых ГХ в растворах UW и ССР в течение 3 суток, показатели ОЕФ незначительно отличались от контроля, а при ГХ в КС были значительно ниже. Через 7 суток культивирования тех же клеток уровень флуоресценции во всех образцах возрастал более чем в 2 раза, что свидетельствует о пролиферации клеток в процессе культивирования. Следует отметить, что существенных различий в восстановлении АВ клетками, хранившимися в суспензии и АМС, установлено не было.

Через 7 суток ГХ в растворах ССР и UW способность МСК восстанавливать АВ была значительно ниже контроля как на 1-е, так и на 7-е сутки культивирования. При этом различий между формами хранения (в виде суспензии или в составе АМС), а также ССР и UW установлено не было. При 7-суточном хранении клеток в КС значение ОЕФ было очень низким как через сутки, так и через 7 суток культивирования. Однако интересно, что даже в этом случае значение ОЕФ через 7 суток культивирования были выше, чем через сутки культивирования. Этот факт является подтвержде-

or 7 days both in suspension and within AMSs under monolayer culture conditions actively proliferated, that testified to the preservation of their functional features (Fig. 3).

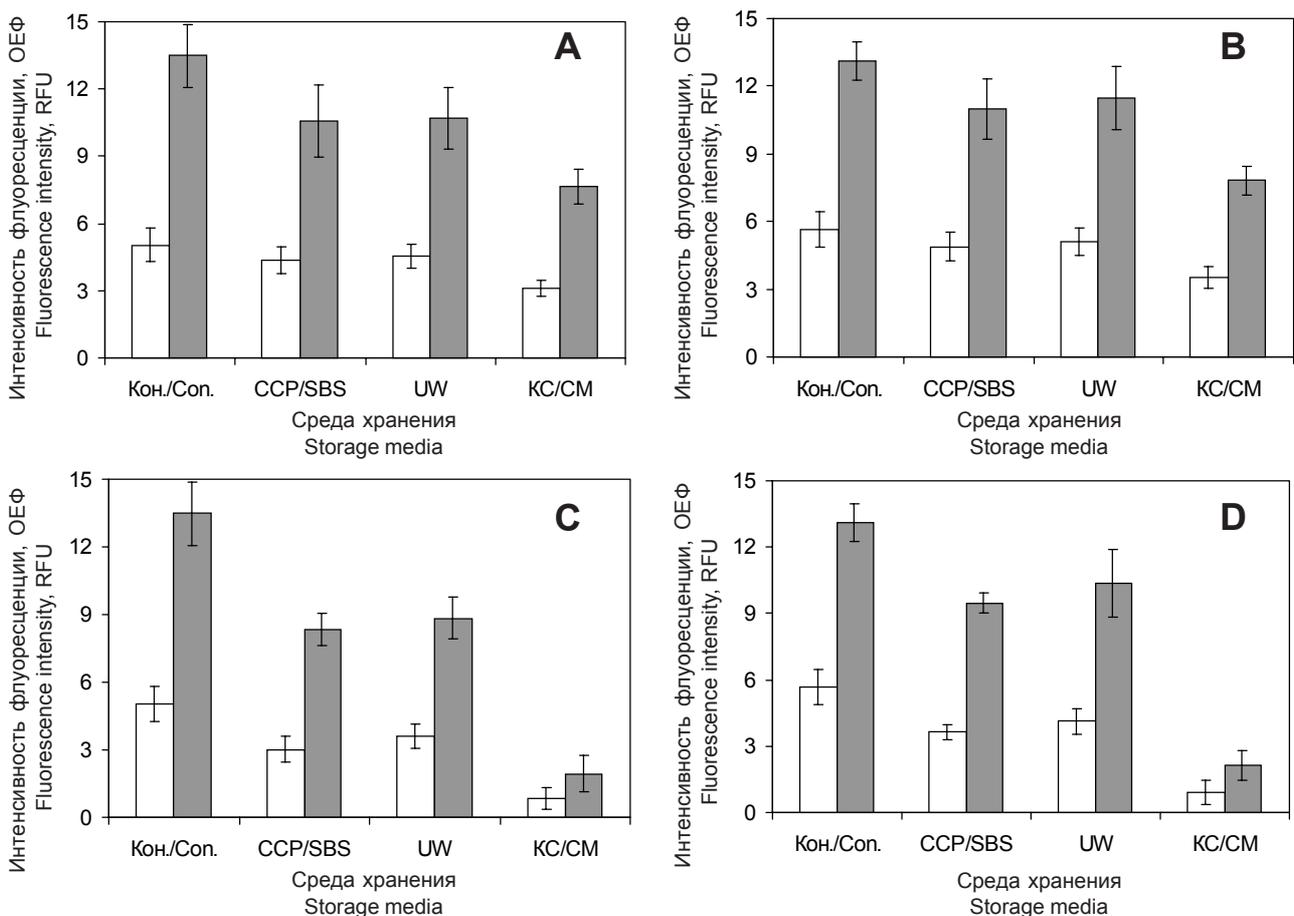
The AB assay may be an objective index of metabolic and proliferative activity of cells. The Fig. 4 shows the data on AB reducing ability of cells, stored in suspensions and within AMSs after 1 and 7 days of monolayer culture. It is seen that after 24 hrs' culturing of cells, previously subjected to HS in SBS and UW solutions for 3 days, the RFU value differed insignificantly from the control, while after HS in CM it was significantly lower. In 7 days of culture of the same cells the level of fluorescence in the all the samples increased more than twice, that testified to a cell proliferation during culture. It should be noted that no significant differences in AB reduction by the cells stored in suspension and within AMSs were revealed.

After 7 days of HS in SBS and UW solutions the ability of MSCs to reduce AB was significantly lower than the control both to day 1 and 7 of culture. In this case no differences between the storage variants (in suspension or within AMSs) and between SBS and UW were established. Following 7-day-long cell storage in CM the RFU value was very low, both after 24 hrs and 7 days of culture. However, of interest was the fact that even in this case the RFU value after 7 days of culture was higher than in 24 hrs of that. This fact confirmed that the cells, survived HS (independently on conditions and medium composition), were capable of proliferating following transferring to a culture environment.



**Рис. 3.** Типичный вид монослая культуры адгезированных МСК до (А) и после 3-х (В) и 7-ми (С) суток гипотермического хранения в среде UW и ССР. Окрашивание флуоресцеин диацетатом.

**Fig. 3.** Typical adherent monolayer culture of the MSCs before (A) and after 3 (B) and 7 days (C) of hypothermic storage in UW and SBS. Fluorescein diacetate staining.



**Рис. 4.** Метаболическая активность МСК в виде суспензии (А, С) и в составе АМС (В, D) после 3-х (А, В) и 7-х (С, D) суток ГХ по АВ-тесту: 1-е (□) и 7-е (■) сутки культивирования; Кон. – контроль; \* – различия значимы по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

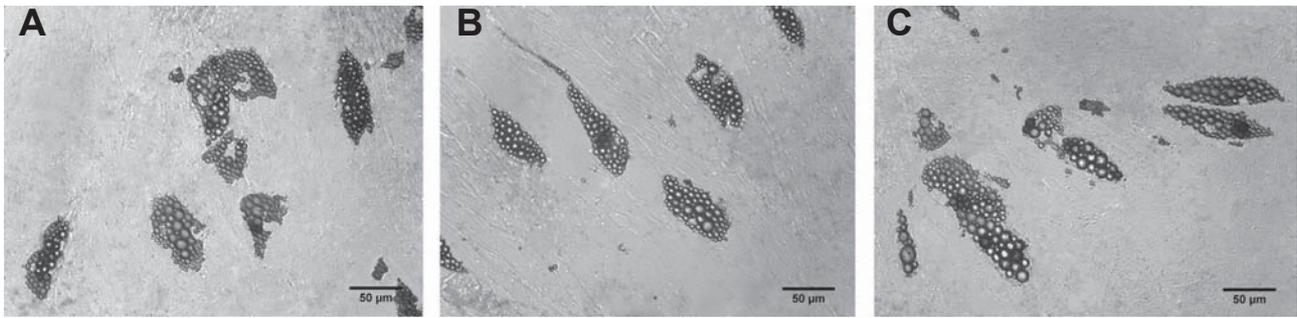
**Fig. 4.** Metabolic activity of the MSCs stored in suspension (A, C) and within AMSs (B, E) after 3 (A, B) and 7 days (C, E) of HS, as determined by AB-test: culture day 1 (□) and 7 (■); Con. – control; \* – statistically significant differences compared to the control,  $p < 0.05$ .

нием того, что клетки, пережившие ГХ (независимо от условий и состава среды), при переводе в условия культуры способны к пролиферации.

Известно, что основным свойством МСК является их способность к индуцированной мультилинейной дифференцировке. В наших эксперимен-

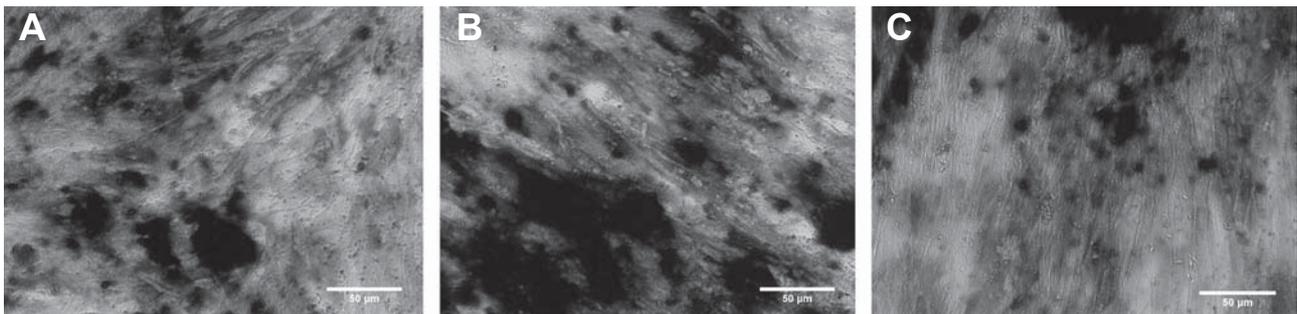
The main property of MSCs is known to be their ability of an induced multilineage differentiation. In our experiments the appropriate inducing factors were added into the media with MSCs, stored hypothermally and transferred to monolayer culture environment. Fig. 5 shows a typical outcome of directed adipogenic





**Рис. 5.** Типичный результат адипогенной дифференцировки МСК до (А) и после 3-х (В) и 7-ми (С) суток гипотермического хранения. Окрашивание Oil Red O.

**Fig. 5.** Typical result of adipogenic differentiation of the MSCs before (A) and after 3 (B) and 7 days (C) of hypothermic storage. Oil Red O staining.



**Рис. 6.** Типичный результат остеогенной дифференцировки МСК до (А) и после 3-х (В) и 7-ми (С) суток гипотермического хранения. Окрашивание Alizarin Red S.

**Fig. 6.** A typical result of osteogenic differentiation of the MSCs before (A) and after 3 (B) and 7 days (C) of hypothermic storage. Alizarin Red S staining.

тах соответствующие индуцирующие факторы добавляли в среды с МСК, предварительно подвергнутыми ГХ и перенесенными в условия моно-слойного культивирования. На рис. 5 представлен типичный результат направленной адипогенной дифференцировки МСК. Видно, что МСК после ГХ в течение 3-х и 7-ми суток в растворе UW и ССР в ходе культивирования приобретали округлую форму и накапливали внутриклеточные липиды в форме характерных вакуолей, которые позитивно окрашивались Oil Red O в розово-красный цвет. По морфологии и интенсивности окрашивания клетки, подвергнутые ГХ, практически не отличались от контрольных.

После гипотермического хранения в средах ССР и UW в течение 3-х и 7-ми суток МСК также сохраняли способность к дифференцировке в остеогенном направлении (рис. 6). После культивирования клеток в присутствии соответствующих индукторов в них накапливался кальций, что приводило к окрашиванию образцов Alizarin Red S в красный цвет.

В клетках, которые культивировались в среде без добавления индукторов, накопления продуктов

дифференцировки МСК. It is seen that MSCs following for 3 and 7 day long HS in SBS and UW gained a rounded shape during culture and accumulated intracellular lipids in specific vacuoles, which were positively stained with Oil Red O in pink-red colour. The cells exposed to HS virtually did not differ from the control ones by morphology and staining intensity.

Following hypothermic storage in SBS and UW media for 3 and 7 days the MSCs also preserved the ability to differentiate into osteogenic direction (Fig. 6). After culturing of cells in the presence of corresponding inducers they accumulated calcium, that resulted in red colour after with specimens staining with Alizarin Red S.

In those cells, cultured in inducer-free medium no accumulation of differentiation products was observed. The ability of cells to directed differentiation under monolayer culture conditions may testify to their functional activity.

The cause of cell death in CM under HS could be, apparently, resulted from ion disbalance due to a decreased activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump. A flux of extracellular substances ( $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ) into a cell breaks an osmotic equilibrium between cell and environment,

дифференцировки не наблюдалось. Способность клеток к направленной дифференцировке в условиях монослойного культивирования может свидетельствовать об их функциональной активности.

Причиной гибели клеток в КС при ГХ следует, по-видимому, считать нарушение ионного баланса в результате сниженной активности  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -насоса. Поток внеклеточных веществ ( $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ ) внутрь клетки нарушает осмотическое равновесие в системе клетка-окружающая среда, приводит к набуханию клеток и, следовательно, их гибели. Использование консервирующей среды UW и ССР, содержащих вместо хлористого натрия непроницающие в клетку соединения (сахароза и ПЭГ-8000 – в ССР; лактобионат и раффиноза – в UW), позволяет поддержать осмотическое равновесие между клеткой и окружающей средой, что способствует сохранению высокой жизнеспособности МСК на протяжении 7 суток ГХ. Важно отметить, что клетки как в суспензии, так и в составе АМС, после ГХ в среде UW и ССР остаются морфологически, метаболически и функционально полноценными – при возвращении в близкие к физиологическим условия монослойного культивирования они распластаются, пролиферируют и демонстрируют способность к индуцированной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях.

### Выводы

Консервирующие среда UW и ССР (при длительном гипотермическом хранении) являются эффективными для сохранения жизнеспособности, метаболической и функциональной активности МСК как в виде суспензии, так и при заключении в АМС. Для гипотермического хранения более перспективен ССР, поскольку он дешевле и проще в приготовлении.

Инкапсуляция в АМС частично предотвращает гибель клеток при гипотермическом хранении в культуральной среде, но не оказывает значимого влияния на сохранность клеток при их хранении в консервирующих растворах.

### Литература

1. Петренко А.Ю., Мазур С.П., Петренко Ю.А. и др. Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // Трансплантология. – 2007. – Т. 9, №1. – С. 218–220.
2. Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г. и др. Стромальные клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии проявляют иммунофенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток // Трансплантология. – 2008. – Т. 10, №1. – С. 84–86.

resulting in cell swelling and, consequently, death. The use of UW and SBS preservation media, where sodium chloride is substituted by non-penetrating into the cell compounds (sucrose and PEG-8000 in SBS; lactobionate and raffinose in UW), allows the maintaining of osmotic equilibrium between cell and environment, that contributes to a high viability of MSCs preserved during 7 days of HS. Of note is the fact, that the cells both in suspension and within AMSs after HS in UW and SBS remain morphologically, metabolically and functionally adequate: when returning to monolayer culture conditions, being close to physiological ones, they are flattened, proliferate and demonstrate the ability for induced differentiation in osteogenic and adipogenic directions.

### Conclusions

The SBS and UW preservation solutions during a prolonged hypothermic storage are efficient for preservation of viability, metabolic and functional activity of MSCs both in suspension and within AMSs. For hypothermic storage the SBS is more promising, being cheaper and easier to prepare.

The encapsulation into AMSs partially prevents cell death under hypothermic storage in culture medium, but causes no significant effect on cell integrity during their storage in preservation solutions.

### References

1. Davis J., editor. Basic cell culture: a practical approach. Oxford, Oxford University Press; 2002.
2. Flaxman B. Cell identification in primary cell cultures from skin. In *Vitro Cellular & Development Biology* – Plant 1974; 10: 112–118.
3. Nolan J.S., Packer L. Monolayer culture techniques for normal human diploid fibroblasts. *Methods Enzymol* 1974; 32(Part B): 561–568.
4. Petrenko A.Yu., Mazur S.P., Petrenko Yu.A. et al. Isolation and multilineage differentiation of stromal cells from human fetal and adult tissue. *Transplantologiya* 2007; 9(1): 218–220.
5. Petrenko A. Yu., Petrenko Yu. A., Skorobogatova N. G. et al. Stromal cells of bone marrow, adipose tissue and skin of the human during the expansion exhibit immunophenotype and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transplantologiya* 2008; 10(1): 84–86.
6. Petrenko O.Y., Semenchenko O.A., Cherkashyna D.V. et al. Media 'Hipolid' for hypothermal preservation of isolated liver Pat. №38844 U Ukraine IPC A01N 1/02. : № 2008 08655; filed. 01.07.2008, publ. 26.01.2009, Bull. №2.
7. Petrenko Yu. A., Skorobogatova N. G., Volkova N. A. et al. Characteristics of immunophenotype and differentiation potential of human mesenchymal bone marrow stromal cells after cryopreservation. *Problems of Cryobiology* 2010; 20(4): 436–442.
8. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 248(5411): 143–147.
9. Pravdyuk A. I., Petrenko Yu. A., Volkova N. A. et al. Properties of mesenchymal stromal human cells encapsulated in alginate microbeads. *Biotechnologiya* 2010; 3(2): 62–69.



3. Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г., Волкова Н.А. и др. Характеристика иммунофенотипа и дифференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №4. – С. 436–442.
4. Правдюк А.И., Петренко Ю.А., Волкова Н.А. и др. Свойства мезенхимальных стромальных клеток человека при инкапсуляции в альгинатные микросферы // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, №2. – С. 62–69.
5. Правдюк А.И., Петренко Ю.А., Холодный В.С. и др. Изучение криочувствительности мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 235–245.
6. Семенченко О.А., Кравченко Л.П., Шанина И.В., Фуллер Б.Д. Розробка розчину консервування для гіпотермічного зберігання ізольованих органів // Трансплантологія. – 2004. – Т. 3. – С. 197–199.
7. Скоробогатова Н.Г., Петренко Ю.А., Волкова Н.А. и др. Изучение способности к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека клонального происхождения // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, №3. – С. 72–77.
8. Пат. №38844 У, Україна, МПК А01N 1/02. Середовище «Гіполід» для гіпотермічного зберігання ізольованої печінки / О.Ю. Петренко, О.А. Семенченко, Д.В. Черкашина та ін.: № 2008 08655; заявл. 01.07. 2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. №2.
9. Basic cell culture: a practical approach / Ed. J. Davis. – Oxford: Oxford University Press, 2002. – 408 p.
10. Flaxman B. Cell identification in primary cell cultures from skin // In vitro Cellular & Development Biology – Plant. – 1974. – Vol. 10. – P. 112–118.
11. Nolan J.S., Packer L. Monolayer culture techniques for normal human diploid fibroblasts // Methods Enzymol. – 1974. – Vol. 32, Part B. – P. 561–568.
12. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – Vol. 248, №5411. – P. 143–147.
13. Shanina I., Kravchenko L. Metabolic properties of isolated rat hepatocytes after long-term storage at 4°C // Problems of Cryobiology. – 1997. – №4. – P. 66–68.
14. Somov A., Semenchenko O., Green C. et al. Mitochondrial function after liver preservation or low ionic-strength solutions: a comparison between UW-based and sucrose-based solution // CryoLetters. – 2009. – Vol. 30. – P. 1–12.
15. Southard J.H., Belzer F.O. Organ preservation // Annu. Rev. Med. – 1995. – Vol. 46. – P. 235–247.
16. Wahlberg J., Eklund T. Hollered comparison of energy metabolism in rat liver grafts during preservation in University of Wisconsin or Euro-Collins solution // Transplant. Proceed. – 1995. – Vol. 27. – P. 721–722.
17. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // Molecular Biology of the Cell. – 2002. – Vol. 13, №12. – P. 4279–4295.
10. Pravdyuk A.I., Petrenko Yu.A., Kholodny V.S. et al. Cryosensitivity of mesenchymal stromal cells encapsulated in alginate microbeads. Problems of Cryobiology 2010; 20(3): 235–245.
11. Semenchenko O.A., Kravchenko L.P., Shanyna I.V., Fuller B.D. Development of preserving solution for hypothermic storage of isolated organs. Transplantologiya 2004; 3: 197–199.
12. Shanina I., Kravchenko L. Metabolic properties of isolated rat hepatocytes after long-term storage at 4°C. Problems of Cryobiology 1997; (4): 66–68.
13. Skorobogatova N. G., Petrenko Yu. A., Volkova N. A. et al. The study of the capability to differentiation in osteogenic and adipogenic directions of human bone marrow mesenchymal stromal cells of clonal origin. Biotechnologiya 2010; 3(3): 72–77.
14. Somov A., Semenchenko O., Green C. et al. Mitochondrial function after liver preservation or low ionic-strength solutions: a comparison between UW-based and sucrose-based solution. CryoLetters 2009; 30: 1–12.
15. Southard J.H., Belzer F.O. Organ preservation. Annu Rev Med 1995; 46: 235–247.
16. Wahlberg J., Eklund T. Hollered comparison of energy metabolism in rat liver grafts during preservation in University of Wisconsin or Euro-Collins solution. Transplant Proceed 1995; 27: 721–722.
17. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002; 13(12): 4279–4295.

