ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ"
"EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY"
Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Наукові статті / Research Articles
ЕСРВ 2019, 3(87): 51–55. https://doi.org/10.25040/

УДК 615.361.013.85.014.41

Оцінка можливості гіпотермічного та субнормотермічного зберігання мезенхімальних стовбурових клітин плаценти в альгінатних носіях

[1]В.Ю. ПРОКОПЮК, [2]В.Ю. ТРИФОНОВ, [3]Р.Я. САФОНОВ,
[3]В.В. ЛАЗУРЕНКО, [2]О.С. ПРОКОПЮК [1]

[1]Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна
[2]ДП «Міжвідомчий науковий центр кріобіології та кріомедицини» НАН, АМН та МОЗ України, Харків, Україна
[3]Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

E-mail: v.yu.prokopiuk@gmail.com

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) плаценти дедалі частіше застосовуються в регенеративній медицині для лікування нейропатій, цукрового діабету, опіків, виразок, неплідддя, передчасного виснаження яєчників, клімактеричного синдрому. Перевагами похідних плаценти є знижена імуногенність, висока проліферативна активність, відсутність етичних проблем, тропність до органів статевої системи [1–3].

Застосування мезенхімальних стовбурових клітин на різних носіях дає змогу модифікувати їхні властивості для лікування конкретної патології. Інкапсуляція МСК в альгінатні носії є порівняно простою методикою та дає змогу знизити імуногенність клітин, подовжити їх функціонування при трансплантації, забезпечити їх доставку до місця ураження [4,5] .

Для медичного застосування біоматеріалу важливо розробити методи короткочасного зберігання під час транспортування від біотехнологічної лабораторії до клініки [6]. У попередніх дослідженнях продемонстровано що в разі кріоконсервування МСК плаценти на альгінатних носіях спостерігається втрата клітин, що зумовлює необхідність пошуку інших методів зберігання [7]. Доведена можливість короткочасного збереження МСК дерми, жирової тканини та гепатоцитів на альгінатних носіях при температурах +4–23°С [5,8,9]. Утім, клітини плаценти різняться від клітин, виділених з інших джерел, навіть якщо вони всі мають характеристики МСК [10]. Таким чином, невирішеними є питання субнормотермічного (+20°С) та гіпотермічного (+4°С) зберігання МСК плаценти в альгінатних структурах. Важливим також є вибір методів швидкої скринінгової оцінки МСК плаценти в альгінатних структурах перед їх клінічним використанням.

Мета роботи – визначення можливості субнормотермічного та гіпотермічного зберігання мезенхімальних стовбурових клітин плаценти в альгінатних носіях.

Матеріали й методи дослідження. Дослідження було проведено в рамках НДР «Дослідження геропротекторної та геротерапевтичної дії плацентарних біооб'єктів» (ДР № 0114U00131).

Плаценти отримували з інформованої згоди жінок після операції кесарів розтин. МСК плаценти отримували ферментативним методом, описаним

© Прокопюк В.Ю., Трифонов В.Ю., Сафонов Р.Я., 2019

Experimental and clinical physiology and biochemistry, ECPB 2019, 3(87): 51–55.
https://doi.org/10.25040/

раніше. Клітини мали характеристики МСК (імунофенотип CD90+, CD73+, CD105+, CD34–, здатні до індукованого диференціювання в адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямках) [7].

Альгінатні мікросфери з клітинами плаценти отримували шляхом полімеризації альгінату натрію в присутності іонів кальцію [5,7]. Для цього готували 1% розчин альгінату натрію на PBS, відтак ресуспензували в отриманому розчині клітини плаценти в концентрації 1×10^6/мл. Через шприц з голкою розміром 29 G капали отриманий розчин в 2% розчин хлориду кальцію з висоти 3–5 мм. Отримані альгінатні мікросфери переносили в середовище DMEM («BioWest», Франція) для подальшого культивування або зберігання.

Альгінатні мікросфери з клітинами плаценти зберігали у середовищі DMEM у щільно закритих поліпропіленових пробірках при субнормотермічних (~ +20°C) та гіпотермічних (~ +4°C) умовах. Кожні 24 год проводили МТТ-тест, тест відновлення резазурину, тест споживання глюкози з середовища. Як позитивний контроль застосовували клітини в альгінатних носіях одразу після виділення, як негативний – клітини, девіталізовані 96% етанолом перед інкапсуляцією.

Проводили оптичне мікроскопічне дослідження з вітальним забарвленням нейтральним червоним, трипановим синім, конфокальну лазерну скануючу мікроскопію із забарвленням флюорисцин діацетатом та пропідіум йодидом (FDA/PI) за раніше описаними протоколами [7].

Для проведення МТТ-тесту альгінатні мікросфери з клітинами плаценти інкубували 4 год в 12-коміркових планшетах у середовищі, DMEM з додаванням МТТ («Sigma», США) в кінцевій концентрації 0,5 мг/мл в CO_2-інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C в атмосфері з 5 % CO_2.

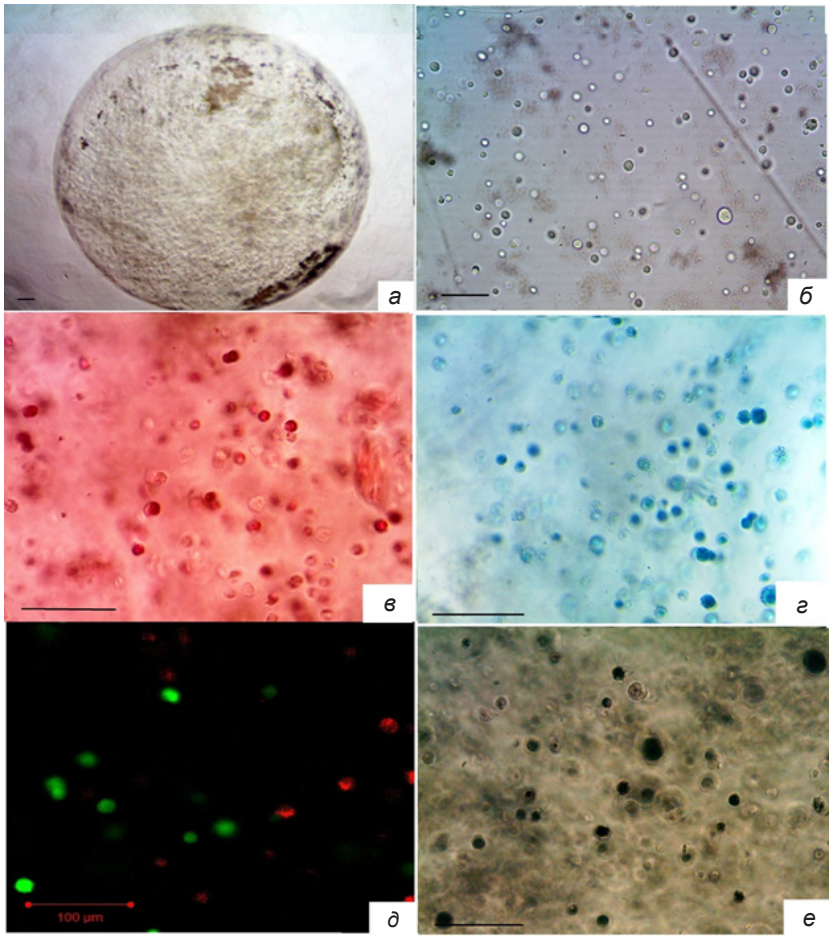
Тест відновлення резазурину проводили аналогічним способом, резазурин («Sigma», США) додавали в кінцевій концентрації 0,15 мг/мл, інкубували 24 год. Оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі PV 1251C (Solar, Білорусь) при довжині хвилі 590 нм.

Визначення поглинання глюкози з живильного середовища проводили за допомогою комерційного набору «Глюкоза Liquid 500 C» (Erba Lachema s.r.o, Чехія) відповідно до інструкції виробника. Вимірювали оптичну щільність середовища інкубування на спектрофотометрі PV 1251C (Solar, Білорусь).

Для обробки зображень застосовували програмне забезпечення ToupView V 3.7 (Hangzhou Toup Tek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China). Для отримання статистично вірогідних висновків застосовували U-критерій Мана-Уїтні. Для статистичних розрахунків та обробки даних використовували програмне забезпечення Past V. 3.15 (University of Oslo, Norway).

Результати та їх обговорення. При полімерізації розчину альгінату натрію з клітинами плаценти в концентрації 10^6/мл в розчині хлористого кальцію отримані альгінатні мікросфери діаметром 1,5–2,0 мм з клітинами плаценти, які знаходилися в окремих комірках, були рівномірно розподілені по мікросферах (рисунок *а, б*).

Для оцінки життєздатності клітини в альгінатних мікросферах забарвлювали нейтральним червоним, трипановим синім, FDA/PI, проводили реакцію МТТ (рис. 1, *в–е*). Клітини забарвлюються вищезгаданими барвниками відповідно до життєздатності так само, як і клітини, не заключені в мікросфери, але є деякі особливості. Так, нежиттєздатні клітини забарвлюються трипановим синім, життєздатні – нейтральним червоним та МТТ. Підрахування клітин, забарвлених трипановим синім або нейтральним червоним ускладнюється насамперед тим, що клітини, які не перебувають у фокусі мікроскопа сприймаються, як незабарвлені. Цю проблему можна вирішити застосуванням конфокальної мікроскопії із забарвленням FDA/PI або забарвленням МТТ, який є більш контрастним. Провести стандартний МТТ-тест з розчином та екстракцією формазану не вдалося через неповну екстракцію МТТ з альгінатних сфер диметилсульфоксидом чи етанолом.



МСК плаценти в альгінатних мікросферах: *а, б* – без забарвлення; *в* – забарвлення нейтральним червоним; *д* – забарвлення три пановим синім; *е* – забарвлення FDA/PI; *е* – забарвлення MTT. Масштабні лінійки 100 мкм.

При субнормотермічному (+20°С) зберіганні альгінатних мікросфер з клітинами плаценти було виявлено значне зниження показників метаболічної активності після 72 год зберігання (табл. 1). Морфологічної різниці при дослідженні мікросфер, що зберігали при субнормотермічних умовах не виявлено протягом усього терміну зберігання.

Таблиця 1

Характеристика клітин плаценти в альгінатних мікросферах після зберігання в субнормотермічних (+ 20°С) умовах (*M* ± *m*)

Зберігання	Тест відновлення резазурину, % зменшення абсорбції	Тест споживання глюкози, мМоль/л
Контроль	53,2 ± 2,8	1,8 ± 0,12
24 год	50,6 ± 3,2	1,7 ± 0,25
48 год	48,3 ± 2,5	2,1 ± 0,18
72 год	32,5 ± 4,1*	2,4 ± 0,16*
96 год	13,9 ± 3,4*	2,5 ± 0,08*

Примітка: * – вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$.

При гіпотермічному зберіганні метаболічна активність вірогідно знижувалась вже після 48 год зберігання (табл. 2). Відсутність морфологічних

змін пов'язували з тим, що клітини знаходяться в окремих комірках та важкодоступні для візуалізації.

Таблиця 2

Характеристика клітин плаценти в альгінатних мікросферах після зберігання в гіпотермічних (+ 4°С) умовах (*M* ± *m*)

Зберігання	Тест відновлення резазурину, % зменшення абсорбції	Тест споживання глюкози, мМоль/л
Контроль	53,2 ± 2,8	1,8 ± 0,12
24 год	47,3 ± 2,4	2,0 ± 1,5
48 год	30,2 ± 3,8*	2,3 ± 0,10*
72 год	12,9 ± 2,1*	2,5 ± 0,07*

Примітка: * – вірогідність різниць з контролем p<0,05.

Таким чином, можна стверджувати, що можна зберігати клітини плаценти в альгінатних носіях у субнормотермічних умовах до 48 год без втрати метаболічних характеристик та структури. Збереження понад 48 год, або в гіпотермічних умовах призводить до зниження метаболічної активності клітин. Це можна пояснити тим, що ферментні системи людини пристосовані до функціонування при +37 °С, зниження температури до +4 °С є для них критичним, тоді як субнормотермічні умови здатні підтримувати метаболізм на рівні, достатньому для виживання [11]. Згідно з даними, отриманими на клітинах жирової тканини, оптимальним діапазоном для зберігання клітин є +15–21°С [9]. Морфологічне дослідження клітин в альгінатних мікросферах є мелоінформативним через важкість візуалізації клітин у тривимірній конструкції та щільність альгінату. Швидкими скринінговими тестами можуть бути забарвлення трипановим синім та МТТ.

Висновки. Для потреб регенеративної медицини доцільно застосовувати субнормотермічне (+20°С) зберігання клітин плаценти в альгінатних сферах не більш ніж 48 год. Збереження понад 48 год у субнормотермічних умовах, або 24 год – у гіпотермічних умовах призводить до різкого зниження метаболічної активності.

Перспективи подальших наукових досліджень. Планується вивчення можливості застосування клітин плаценти в альгінатних сферах для лікування експериментальної гінекологічної патології.

ПОСИЛАННЯ

1. *Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, Pianta S, Parolini O.* The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. Front Bioeng Biotechnol. 2015 Oct 19;3:162. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00162

2. *Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D.* Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. Stem Cells International. 2018:14. doi:10.1155/2018/4837930

3. *Prokopiuk VYu.* Influence of media conditioned by cryopreserved and fresh placental explants and cells on murine uterine and ovarian organotypic cultures. Probl Cryobiol Cryomed. 2018;28(2):139–150.

4. *Davis MS, Marrero-Berrios I, Perez XI, Rabolli CP, Radhakrishnan P2, Manchikalapati D et al.* Alginate encapsulation for bupivacaine delivery and mesenchymal stromal cell immunomodulatory cotherapy. J Inflamm Res. 2019;12:87–97. doi: 10.2147/JIR.S192749.

5. *Tarusin D, Mazur S, Volkova N, Petrenko Yu, Zaikov V, Petrenko A.* Encapsulation of mesenchymal stromal cells in alginate microspheres Biotechnologia Acta. 2016;9(4):58-66.

6. *Giwa S, Lewis JK, Alvarez L, Langer R, Roth AE, Church GM et al.* The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. Nat Biotechnol. 2017 Jun 7;35(6):530–42. DOI: 10.1038/nbt.3889

7. *Pogozhykh O, Prokopyuk V, Prokopyuk O, Kuleshova L, Goltsev A, Figueiredo C, et al.* Towards biobanking technologies for natural and bioengineered multicellular placental constructs. Biomaterials. 2018;185;39-50.

8. *Mahler S, Desille M, Frémond B, Chesné C, Guillouzo A, Campion JP et al.* Hypothermic storage and cryopreservation of hepatocytes: the protective effect of alginate gel against cell damages. Cell Transplant. 2003;12(6):579–92.

9. *Swioklo S, Constantinescu A, Connon CJ.* Alginate-encapsulation for the improved hypothermic preservation of human adipose-derived stem cells. Stem cells transl med. 2016;5(3):339–49.

10. *Chen JY, Mou XZ, Du XC, Xiang C.* Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. Asian Pac J Trop Med. 2015;8(9):739–46.

11. *Van de Kerkhove M P, Hoekstra R, van Nooijen FC, Spoelstra FO, Doorschodt BM, van Wijk AC et al.* Subnormothermic preservation maintains viability and function in a porcine hepatocyte culture model simulating bioreactor transport. Cell Transplant. 2006; 15(2):161–8.

Стаття надійшла до редколегії 10.07.2019

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the possibility of hypothermic and subornorthomeric storage of placental mesenchymal stem cells in alginate carriers

[1]V.Y. PROKOPIUK, [2]V.Y. TRIFONOV, [3]R.A. SAFONOV,
[3]V.V. LAZURENKO, [2]O.S. PROKOPIUK

[1]Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
[2]State Enterprise "Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine"
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Academy of Medical Sciences and Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
[3]Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine,

E-mail: v.yu.prokopiuk@gmail.com

Mesenchymal stem cells (MSCs) are actively used in regenerative medicine to treat neuropathies, diabetes mellitus, burns, ulcers, infertility, premature ovarian failure and climacteric syndrome. MSCs application on different carriers allows to modify their properties for the different pathology treatment. For the biomaterials medical application, it is important to develop short-term storage methods for their transportation from the biotechnological laboratory to the clinic.

The aim of the study was to determine the possibility of subnormothermic and hypothermic storage of placental mesenchymal stem cells in alginate carriers.

Placental MSCs were isolated with enzymatic method from placenta of women after cesarean section with informed consent. Encapsulation in alginates was done by dropping of 1% sodium alginate solution with cells in a 2% calcium chloride solution. The cells in the alginate beans were stored in a medium in subnormothermic (~ + 20ºC) and hypothermic (~ + 4ºC) conditions. Every 24 hours morphological study with trypan blue, neutral red, FDA/PI staining, resazurin recovery test, and glucose test was performed.

When polymerizing a solution of sodium alginate with placental cells at a concentration of 10^6/ml in a solution of calcium chloride, alginate microspheres with a diameter of 1.5–2.0 mm with placental cells where obtained. Cells were evenly distributed over the microspheres in separate cavities. Cells are stained with the trypan blue, neutral red, FDA/PI according to viability, as are cells that are not encapsulated in microspheres. The non-viable cells where stained with trypan blue, viable cells where stained with neutral red and MTT. A standard MTT test with formazan extraction was not indicative due to incomplete formazan extraction from alginate spheres with dimethyl sulfoxide or ethanol. Resazurin recovery test and glucose test were indicative.

After 72 hours of subnormothermic storage of alginate microspheres with placental cells, it was found that a significant metabolic activity decreasing. In hypothermic storage, metabolic activity was decreased after 48 hours of storage. It can be explained by the adaptability of human enzyme systems to functioning at 37 °C and the temperature decreasing to 4 °C is critical for them, while subnormothermic conditions are able to maintain metabolism at a level sufficient for survival. The morphological study of cells in alginate microspheres was not informative, because of the difficulty cells visualizing in a three-dimensional structure and the density of alginate. Rapid screening tests may include trypan blue staining and MTT test.

Conclusions. Placental cells in alginate microsphers can be stored in subnormothermic (+20°C) conditions no more than 48 hours. Storage more than 48 hours in subnormothermic conditions, or 24 hours in hypothermic conditions leads to a sharp metabolic activity decreasing.

Key words: MSC, placenta, alginate, subnormothermia, hypothermia, storage.