

## OPRACOWANIE WARUNKÓW KRIOKONSERWACJI HETEROGENNYCH KOMÓREK MSC WYZIOLOWANYCH ZE SZPIKU KOSTNEGO ŚWINI I KONIA

Jolanta Opiela, Joanna Jurkiewicz, Lechosław Gajda,  
Agnieszka Wierzchoś-Hilczer

Instytut Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego,  
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, 32-083 Balice k. Krakowa

*Oceniano kriokonserwację komórek MSC wyizolowanych ze szpiku kostnego koni i świń w roztworach różniących się stężeniami Me<sub>2</sub>SO, datą produkcji (lotem) oraz porównywano dwie techniki zamrażania. Pożywka o niższym stężeniu krioprotektanta jest klinicznie pożądana z uwagi na jego szkodliwość, a także aby usprawnić procedury kliniczne i laboratoryjne użycia kriokonserwowanych MSC. Niestety według naszych wyników zmniejszenie stężenia Me<sub>2</sub>SO z 10% do 5% powoduje negatywne skutki i dlatego nie jest zalecane. Ponadto zaproponowano mało zaawansowany technologicznie, ale wydajny system zamrażania, który z powodzeniem mógłby być stosowany przez różne podmioty w terenie.*

*Słowa kluczowe: MSC, koń, świnia, mrożenie, Me<sub>2</sub>SO*

Wyniki dotychczasowych przedklinicznych i klinicznych badań przydatności MSC w medycynie regeneracyjnej wskazują na bezpieczeństwo ich użycia i niewielkie zagrożenie efektami niepożądanymi. Biorąc to pod uwagę, można sądzić, że już wybrane metody terapii przy użyciu MSC mogą być wprowadzone do rutynowych zastosowań klinicznych. Jednak kluczowym zagadnieniem przy wykorzystaniu MSC w terapii regeneracyjnej jest opracowanie efektywnego sposobu mrożenia komórek. Niestety obecnie wykonywane procedury w procesie mrożenia i rozmrażania skutkują utratą nawet 30% komórek. Znajomość protokołów kriokonserwacji, które zachowują niezmienną właściwość pierwotnych komórek macierzystych, jest niezwykle ważna dla hodowli komórkowych i przechowywania komórek macierzystych. Do dłuższego przechowywania, komórki są zwykle powoli zamrażane i przechowywane w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$  w ciekłym azocie. Powolne schładzanie zapobiega groma-

dzeniu się wewnątrzkomórkowego lodu, który może spowodować pęknięcie błony komórkowej, jak również może spowodować odwodnienie komórek poprzez tworzenie zewnątrzkomórkowego lodu. Aby temu zapobiec, powinno się zastosować idealną szybkość chłodzenia przy wybranym krioprotektancie. Ogólne właściwości wymagane dla związków kriochronnych to niska masa cząsteczkowa, brak toksyczności i niska cena (Moon i in., 2008; Ozkavukcu i Erdemli, 2002). Krioprotektanty dzielą się na dwie główne klasy: środki wewnątrzkomórkowe, które zapobiegają przenikaniu płynów do wnętrza komórek, tworzeniu kryształków lodu i pękaniu błony (tj. dimetylo sulfotlenek (Me<sub>2</sub>SO), glicerol i glikol etylenowy) i związki pozakomórkowe, które nie przenikają przez błonę komórkową i działają poprzez zmniejszenie efektu hiperosmotycznego występującego w procedurze zamrażania. Wśród nich znajdują się sacharoza, trehaloza, dekstroza, i poliwinylpirolidon (Ozkavukcu i Erdemli, 2002; Janz i in., 2012). Główny powszechnie stosowany środek krioprotekcyjny, dimetylo-sulfotlenek (Me<sub>2</sub>SO), zapewnia wysoki współczynnik przeżywalności komórek po zamrożeniu, ale kilka opublikowanych prac wskazuje, że może promować różnicowanie komórek macierzystych w linię neuronalną, a także wykazuje cytotoksyczność w temperaturze pokojowej (Syme i in., 2004; Janz i in., 2012). Obecnie istnieje niewiele alternatywnych krioprotektantów dla Me<sub>2</sub>SO. Inne substancje, takie jak glicerol, sacharoza czy trehaloza nie wykazują cytotoksyczności, ale nadal wymagają dokładniejszej oceny jako krioprotektanty dla MSC.

Szereg badań potwierdza przydatność MSC do leczenia uszkodzeń układu kostnoszkieletowego, szczególnie u koni. W takich sytuacjach MSC służą do zasiedlania naturalnych lub sztucznych rusztowań wszczepianych w miejsca, w których istnieje potrzeba uzupełnienia brakującej kości lub chrząstki (Phadke i in., 2013; Khojasteh i in., 2013). Materiałem budulcowym rusztowań mogą być naturalnie występujące związki, takie jak: kolagen, fibryna, alginiana, agaroz, hialuronian, czy chitosan, a także syntetyzowane struktury zbudowane z polimerów kwasu mlekowego czy poliglikolowego (Khan i in., 2010). Ponadto rozpoczęto badania przedkliniczne i kliniczne skoncentrowane na regeneracji więzadeł i ścięgien u tego gatunku (Gulotta i in., 2012; Alberton i in., 2012). Istotna dla konia jest również możliwość wykorzystania MSC do regeneracji mięśni szkieletowych (Tsai i in., 2013; Winkler i in., 2012) poprzez lokalną regulację endogennych procesów naprawczych. Świnie, jak wiadomo, są właściwym modelem dla badania ludzkich chorób w tym chorób genetycznych ze względu na ich podobieństwo anatomiczne, fizjologiczne i genetyczne. Skóra świńska była wykorzystywana do przeszczepów u ludzi (Jiong i in., 2010), a także jako model biomedyczny (Motlik i in., 2007) w terapii zastępczej skóry, w tym jako substytutu skóry wytworzonej metodami inżynierii tkankowej (Middelkoop i in., 2004). Ponadto świńskie MSC (pMSC) zostały wykorzystane jako ważny model medyczny do zastosowania w regeneracji sztucznych kości i zębów u ludzi (Fang i in., 2007; Poncelet i in., 2007). Dlatego też proponujemy przeprowadzenie naszych badań na koniu i świni. Uzyskane wyniki w przypadku świni stanowiłyby również przyczynek do prac z zakresu przeszczepów ksenogenicznych (świnia-człowiek).

Celem naszego doświadczenia było opracowanie warunków kriokonserwacji komórek MSC wyizolowanych ze szpiku kostnego pobranego od konia i świni. Nasze

wcześniejsze wyniki i obserwacje dowodzą, że komórki macierzyste są bardziej wrażliwe na mrożenie–rozmarzanie niż komórki somatyczne. Przesłanką było wykorzystanie w praktyce jako środka terapeutycznego MSC pozyskanych od tych zwierząt. Zależało nam na zaproponowaniu nieskomplikowanego technologicznie, prostego systemu zamrażania, który byłby dostępny w usługach w terenie. Dużym atutem naszego doświadczenia jest użycie MSC izolowanych ze szpiku kostnego konia. Podsygnalizowane jest to możliwością aplikacyjnego wykorzystania tych komórek dla celów regeneracji tkanki chrzęstnej i kostnej.

## Material i metody

Wszystkie odczynniki wykorzystane w naszym doświadczeniu zakupiono w firmie Sigma-Aldrich, Polska z wyjątkiem przeciwciał i kitów wykorzystywanych do analiz na cytometrze przepływowym.

Etapy doświadczenia:

Pobieranie poubojowo szpiku od konia i świni, izolacja komórek MSC ze szpiku oraz wyprowadzenie linii pierwotnej MSC ww. gatunków zwierząt i hodowla *in vitro* (Opiela i in., 2016).

- Potwierdzenie mezenchymalnego charakteru wyprowadzonych linii komórek MSC na poziomie białek przy użyciu cytometrii przepływowej (CD90, CD73, CD105, CD31, CD34 – co najmniej 3 markery) i immunocytochemii z uwagi na wyniki odbiegające od oczekiwanych (Gurgul i in., 2017, 2018).

- Mrożenie komórek dwoma sposobami:

- 1) mrożenie dwustopniowe: 10% Me2SO w FCS 2 godz.  $-20^{\circ}\text{C}$  i kolejne 2 godz.  $-80^{\circ}\text{C}$  w 3 wariantach mediów do mrożenia:

- a) 10% Me2SO w FCS;
- b) 5% Me2SO w FCS;
- c) 5% Me2SO, 50% FBS, 45% DMEM;

- 2) pudełko do mrożenia Mr. Frosty: komórki MSC zawieszono w 3 wariantach mediów do mrożenia:

- a) 10% Me2SO w FCS;
- b) 5% Me2SO w FCS;
- c) 5% Me2SO, 50% FBS, 45% DMEM;

umieszczano w pojemniku do mrożenia „Nalgene Mr. Frosty” firmy Thermo Scientific uzupełnionym alkoholem izopropylowym do 250 ml, co zapewnia powtarzalną szybkość chłodzenia  $1^{\circ}\text{C}$  na minutę w zamrażarce mechanicznej przy  $-80^{\circ}\text{C}$  przez minimum 4 godziny. Tak zamrożone próbki przekładano do ciekłego azotu.

Czynnikami doświadczalnymi były również krioprotektanty Me2SO o różnych nr katalogowych i dacie produkcji (D4540 i D2650 Sigma-Aldrich).

- Ocena morfologiczna komórek po rozmrożeniu wykonywana była 24 godz. po założeniu hodowli oraz przy każdej zmianie pożywki wykonywanej co 48 godz.

do momentu uzyskania konfluencji na poziomie 90%. Obecność licznych komórek pływających w pożywce, nieprzyklejonych do podłoża, o nieprawidłowym, czyli nieregularnym kształcie błony komórkowej, któremu towarzyszyła utrata wrzecionowatego lub romboidalnego kształtu, świadczyła o niskiej jakości hodowli czyli negatywnym wpływie techniki mrożenia.

- Ocena uszkodzeń błony komórkowej, liczby martwych komórek za pomocą cytometrii przepływowej: do analizy wykorzystano Kit Live/dead (Invitrogen). Do próbki o objętości 1 ml i koncentracji komórek 1 mln/ml dodawano 5 mikrolitrów SYBR-14 i inkubowano przez 10 min w temp. 37°C. Następnie dodawano 5 µl roztworu PI i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Tak przygotowaną próbkę analizowano na cytometrze CytoFLEX (Beckman Coulter, USA). Do wzbudzenia używano lasera 488 nm oraz filtrów: zielonego (530/30) dla Sybr-14 oraz czerwonego (610/20) dla jodku propydydy. Otrzymane wyniki analizowano za pomocą programu CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, USA).

- Ocena apoptozy za pomocą cytometrii przepływowej: do analizy wykorzystano Kit Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #4 (Invitrogen). Do próbki o objętości 1 ml i koncentracji komórek 1 mln/ml dodawano 1 mikrolitr YO-PRO™-1 i 1 mikrolitr jodku propydydy 1 mg/ml(PI). Próbkę inkubowano przez 20–30 min na lodzie. Tak przygotowaną próbkę analizowano na cytometrze (CytoFLEX (Beckman Coulter, USA) w ciągu maksymalnie 2 godzin. Do wzbudzenia używano lasera 488 nm oraz filtrów: zielonego (530/30) dla YO-PRO-1 oraz czerwonego (610/20) dla jodku propydydy. Otrzymane wyniki analizowano za pomocą programu CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, USA).

## Wyniki

### **Potwierdzenie mezenchymalnego charakteru wyprowadzonych linii komórek MSC**

Komórki użyte w niniejszym doświadczeniu zostały scharakteryzowane w ramach wcześniejszych doświadczeń opisanych przez Opielę i in. (2016) oraz Gurgula i in. (2017, 2018).

### **Próba mrożenia MSC świni – ocena morfologiczna**

Ocenę wykonano na 3 osobnikach, a ponieważ obraz morfologiczny był zbliżony, nie przedstawiamy pojedynczych osobników.

Tabela 1. Ocena morfologiczna komórek świni mrożonych 2 sposobami, w 3 różnych mediach i tym samym krioprotektancie, ale o różnych nr katalogowych i dacie produkcji  
 Table 1. Morphological assessment of porcine cells frozen according to 2 methods in 3 different media using the same cryoprotectant differing in catalogue number and production date

Technika mrożenia – Mr. Frosty Krio-BOX Mr. Frosty Cryo freezing container technique					
Krioprotektant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich) Cryoprotectant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich)	Krioprotektant Me2SO (D2650 Sigma-Aldrich) Cryoprotectant Me2SO (D2650 Sigma-Aldrich)				
6 wariantów pożywek do mrożenia Six media variants for freezing					
1	2	3	4	5	6
10%Me2SO	5% Me2SO	5% Me2SO +50%FBS+ pożywka/medium	10% Me2SO	5% Me2SO	5%+50%FBS+ pożywka/ medium
Kolonie o prawidłowej morfologii 3/5, prawidłowe komórki tylko w koloniach, poza koloniami nierregularne ściany komórkowe, cytoplazma o nierregularnym, poszarpanym kształcie, widoczne martwe komórki w pożywce Colonies with normal morphology 3/5, normal cells only in colonies, irregular cell walls outside colonies, cytoplasm with irregular jagged shape, dead cells observed in medium	Tylko jedna kolonia na całej pow. butelki, kolonia 2/5, nieprawidłowa morfologia komórek Only 1 colony on the bottle surface, colony 2/5, abnormal cell morphology	Ocena jak w war. 2, dwie małe kolonie na pow. butelki Assessment as under 2, 2 small colonies on the bottle surface	Ocena kolonii 2/5, opis podobny jak w war. 1 Assessment of colony 2/5 description as in var. 1	Kolonie o prawidłowej morfologii 3/5, prawidłowe komórki tylko w koloniach, poza koloniami nierregularne poszarpane ściany komórkowe, cytoplazma o nierregularnym, poszarpanym kształcie, widoczne martwe komórki w pożywce Colonies with normal morphology 3/5, normal cells only in colonies, irregular jagged cell walls outside colonies, cytoplasm with irregular jagged shape, dead cells observed in medium	Kilka kolonii, morfologia +, pojedyncze komórki z cytoplazmą o nierregularnym, poszarpanym kształcie, dużo martwych komórek Several colonies, morphology +, single cells with cytoplasm having irregular jagged shape, many dead cells

cd. tab. 1 – Table 1 contd.

**Mrożenie 2-stopniowe –20°C i –80°C**  
**Two-stage freezing at –20°C and –80°C**

Krioprotektant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich) Cryoprotectant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich)		Krioprotektant Me2SO (D2650 Sigma-Aldrich) Cryoprotectant Me2SO (D2650 Sigma-Aldrich)			
<b>6 wariantów pożywek do mrożenia</b> <b>Six media variants for freezing</b>					
1	2	3	4	5	6
10%Me2SO	5% Me2SO	5% Me2SO +50%FBS+ pożywka/medium	10% Me2SO	5% Me2SO	5%+50%FBS+ pożywka/ medium
Nieprawidłowa morfologia komórek, cytoplazma o nierównym, poszarpanym kształcie zaobserwowano tylko jedną kolonię, obecne martwe komórki w pożywce	Morfologia, podobnie jak w war. 1, rozproszone kolonie, nie-liczne komórki, obecne martwe komórki w pożywce	Kolonie są obecne, ale hodowla znacznie gorsza od war. 5 i 6, obecne liczne komórki o nierównym, poszarpanym kształcie, obecne martwe komórki w pożywce	Dużo kolonii, liczebność komórek najwyższa ze wszystkich prób, kolonie bardziej rozproszone, morfologicznie nieprawidłowe, obecne martwe komórki w pożywce	Liczbowo dużo kolonii, również obecne komórki o nieprawidłowej morfologii, obecne martwe komórki, choć hodowla ogólnie lepsza	Dużo kolonii, jakościowo lepsza hodowla w porównaniu do poprzednich, poza koloniami pojedyncze komórki o nierównym kształcie cytoplazmy
Abnormal cell morphology, cytoplasm with irregular jagged shape, only one colony observed, dead cells present in medium	1, scattered colonies, few cells, dead cells present in medium	Colonies are present but culture inferior to 5 and 6, many cells with irregular jagged shape present, dead cells present in medium	Many colonies, highest number of cells in all samples, colonies more scattered, morphologically abnormal, dead cells present in medium	Many colonies, cells with abnormal morphology also present, dead cells present although culture generally better	Many colonies, better quality culture compared to previous ones, single cells with irregular cytoplasm shape outside colonies

Tabela 2. Komórki MSC żywe i martwe świnii oceniane kitem Live/Dead na cytometrze przepływowym w różnych wariantach mrożenia  
 Table 2. Live and dead porcine MSC cells, analysed flow cytometrically using a Live/Dead kit, according to freezing treatment

Wariant mrożenia Freezing treatment	Odsetek komórek z nieuszkodzoną błoną Proportion of cells with intact membrane	Odsetek komórek apoptotycznych Proportion of apoptotic cells
1	63,79%	45,59%
2	50,25%	43,58%
3	63,04%	40,83%
4	60,74%	38,19%
5	58,85%	28,76%
6	65,36%	32,93%
K	53,63%	33,43%

MSC poddano mrożeniu w różnych pożywkach (wariant mrożenia), komórki mrożono w Mr. Frosty cryo-box i oceniono po 3-dniowej hodowli od rozmrożenia.  
 MSC were frozen in different media (freezing treatments), cells were frozen in Mr. Frosty cryo-box and evaluated following 3 days of culture after thawing.

Tabela 3. Ocena morfologiczna komórek konia mrożonych 2 sposobami, w 3 różnych mediach i tym samym krioprotektancie, ale o różnych nr katalogowych i dacie produkcji

Table 3. Morphological assessment of equine cells frozen according to 2 methods in 3 different media using the same cryoprotectant differing in catalogue number and production date

**Technika mrożenia – Mr. Frosty Krio-BOX**  
**Mr. Frosty Cryo freezing container technique**

Krioprotektant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich) Cryoprotectant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich)		Krioprotektant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich) Cryoprotectant Me2SO (D2650 Sigma-Aldrich)	
<b>6 wariantów pożywek do mrożenia</b> <b>Six media variants for freezing</b>			
1	2	3	4
10%Me2SO	10%Me2SO	10%Me2SO	10%Me2SO
<i>Ponizszy opis hodowli w 3 wierszach odnosi się do 3 osobników</i> <i>The following culture description in 3 rows refers to 3 individuals</i>			
95% konfluencji, prawidłowa morfologia 95% confluence, normal morphology	Konfluencja 60–70% 60–70% confluence	Konfluencja i morfologia komórek widocznie gorsza w porównaniu do wat. 1 i 2 Confluence and morphology much inferior compared to samples 1 and 2	95% konfluencji, prawidłowa morfologia 95% confluence, normal morphology
Prawidłowa morfologia, pojedyncze martwe komórki i cytoplazma o nierównym, poszarpanym kształcie, wysoka konfluencja Normal morphology, single dead cells and cytoplasm with irregular jagged shape, high confluence	Konfluencja 40–50% 40–50% confluence		Brak komórek No cells
Prawidłowa morfologia, 95% konfluencji Normal morphology, 95% confluence	Konfluencja 50–60% 50–60% confluence	Prawidłowa morfologia, 95% konfluencji Normal morphology, 95% confluence	Brak komórek No cells
			5
			10%Me2SO
			6
			10%Me2SO
95% konfluencji, prawidłowa morfologia 95% confluence, normal morphology	Konfluencja 60–70% 60–70% confluence	Konfluencja i morfologia komórek widocznie gorsza w porównaniu do wat. 1 i 2 Confluence and morphology much inferior compared to samples 1 and 2	95% konfluencji, prawidłowa morfologia 95% confluence, normal morphology
Prawidłowa morfologia, pojedyncze martwe komórki i cytoplazma o nierównym, poszarpanym kształcie, wysoka konfluencja Normal morphology, single dead cells and cytoplasm with irregular jagged shape, high confluence	Konfluencja 40–50% 40–50% confluence		Niska konfluencja – trochę wyższa od (2), ale nieprawidłowa morfologia – 40% cytoplazma o nierównym, poszarpanym kształcie Low confluence, slightly higher than (2) but abnormal morphology – 40% of cytoplasm with irregular jagged shape
Prawidłowa morfologia, 95% konfluencji Normal morphology, 95% confluence	Konfluencja 50–60% 50–60% confluence	Prawidłowa morfologia, 95% konfluencji Normal morphology, 95% confluence	Konfluencja 70–80%, pojedyncze martwe komórki 70–80% confluence, single dead cells



Mrożenie 2-stopniowe -20°C i -80°C Two-stage freezing at -20°C and -80°C					
Krioprotektant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich) Cryoprotectant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich)		Krioprotektant Me2SO (D4540 Sigma-Aldrich) Cryoprotectant Me2SO (D2650 Sigma-Aldrich)			
6 wariantów pożywek do mrożenia Six media variants for freezing					
1	2	3	4	5	6
10%Me2SO	10%Me2SO	10%Me2SO	10%Me2SO	10%Me2SO	10%Me2SO
Morfologia prawidłowa, dużo pojedynczych martwych komórek Normal morphology, many single dead cells	Nieznacznie gorsza morfologia, więcej martwych komórek w pożywce w porównaniu do war. 1 Slightly inferior morphology, more dead cells in medium compared to 1	Bardzo mało komórek o nieprawidłowej morfologii Very few cells with abnormal morphology	Brak komórek No cells	Konfluencja 10-20%, morfologia niezadawalająca 10-20% confluence, unsatisfactory morphology	Pojedyncze komórki w polu widzenia o nieregularnych kształtach Single irregular shaped cells in the field of vision
Morfologia prawidłowa, dużo pojedynczych martwych komórek Normal morphology, many single dead cells	Nieprawidłowa morfologia Niska konfluencja Dużo martwych komórek w pożywce Abnormal morphology Low confluence Many dead cells in medium	Konfluencja ok. 40% niższa niż w tej samej grupie mrożonej Mr. Frosty, zaawansowane zmiany morfologiczne, utracona wrzecionowatość Confluence around 40% lower than in the same group frozen with Mr. Frosty, advanced morphological changes, loss of spindle shape	Bardzo mało komórek o nieprawidłowej morfologii Very few cells with abnormal morphology	Bardzo mało komórek o nieprawidłowej morfologii Very few cells with abnormal morphology	Brak komórek No cells

*Poniższy opis hodowli w 3 wierszach odnosi się do 3 osobników  
The following culture description in 3 rows refers to 3 individuals*

cd. tab. 3 – Table 3 contd.

1	2	3	4	5	6
Morfologia prawidłowa, dużo pojedynczych martwych komórek w pożywce Normal morphology, many single dead cells in medium	Nieznacznie gorsza morfologia, więcej martwych komórek w pożywce w porównaniu do 1 Slightly inferior morphology, more dead cells in medium compared to 1	Konfluencja niższa od próby 2. Morfologia w większości prawidłowa. Obecne martwe komórki w pożywce Confluence lower than in sample 2. Mostly normal morphology. Dead cells present in medium	Opis jak wyżej + w powyższe więcej martwych komórek Description as above + more dead cells in medium	Brak komórek No cells	Pojedyncze komórki o nieprawidłowej morfologii Single cells with abnormal morphology

Tabela 4. Komórki MSC żywe i martwe koni w poszczególnych wariantach mrożenia  
 Table 4. Live and dead equine MSC cells according to freezing treatment

Numer konia No. of horse	Wariant mrożenia Freezing treatment	Odsetek komórek z nieuszkodzoną błoną Proportion of cells with intact membrane
1	1	93,74%
1	2	94,97%
1	3	93,27%
1	4	93,41%
1	5	91,63%
2	1	87,66%
2	2	91,42%
2	3	90,38%
2	4	90,35%
2	5	90,20%
3	4	90,71%
3	5	90,16%
3	1,2,3	Nie poddano analizie z powodu zbyt małej wyjściowej liczby komórek Not analysed due to the low initial number of cells

MSC poddano różnym sposobom mrożenia i oceniono po 3-dniowej hodowli od rozmrożenia.

MSC were subjected to different freezing treatments and evaluated following 3 days of culture after thawing.

Znaczenie dla efektywności mrożenia rozumianej jako prawidłowa morfologia komórek po rozmrożeniu, niski odsetek komórek uszkodzonych w wyniku mrożenia i zamrażania (uszkodzenia błon komórkowych i apoptoza) ma stężenie krioprotektanta, w naszym przypadku Me2SO. Skuteczne jest stężenie 10% w FBS, natomiast obniżenie stężenia do 5% wpływa negatywnie na konfluencję i jakość morfologiczną komórek w hodowli *in vitro*. Według naszej oceny obniżenie stężenia FBS i zastąpienie w części objętości FBS przez pożywkę wpływa negatywnie na jakość komórek po rozmrożeniu, przeżywalność i konfluencję. Powyższe obserwacje są bardziej wyraziste w przypadku stosowania dwustopniowej procedury mrożenia. U koni wyniki te nie były tak jednoznaczne jak u świń, różnica osobnicza u tego gatunku jest znacznie bardziej widoczna, jednak ogólne wnioski w naszej ocenie pokrywają się u obu analizowanych gatunków. W przypadku MSC świń wykonano analizę uszkodzenia błon komórkowych i apoptozy w zależności od stosowanego wariantu mrożenia, niestety tylko na jednym osobniku. Widoczna jest tendencja stosunkowo wysokiego uszkodzenia błon komórkowych we wszystkich wariantach u świń, sięgająca od 36 do prawie 50%. U konia uszkodzenia te są znacznie mniejsze, ponieważ wynoszą tylko od do 12,3%. Z punktu widzenia oceny morfologicznej komórek nie ma znaczenia lot krioprotektanta Me2SO ani nawet data produkcji (D4540 vs. D2650). Jednak wyniki oceny apoptozy zdają się temu przeczyć. Niestety ocenę apoptozy wykonano tylko na MSC świń pochodzących od 1 osobnika, a otrzymane dane są interesujące, gdyż tylko w przypadku wariantu 5, czyli mrożenia w 5% Me2SO (D2650 – świeży odczynnik) w FBS odnotowano najniższy odsetek komórek apoptotycznych, a najwyższy

w wariantach 1 i 2, czyli 10% i 5% Me2SO (D4540- stary odczynnik) w FBS. Kwestia ta wymaga dalszej szczegółowej analizy.

### Omówienie wyników

Kriokonserwacja MSC ma kilka innych zalet, takich jak oszczędność czasu i pożytki hodowlanej, ochrona przed infekcją/skażeniem, dryf genetyczny czy unikanie odrzucenia immunologicznego przy autoprzeszczepie (Xiang i in., 2007). Jednak konwencjonalne powolne zamrażanie zawsze wiązało się z uszkodzeniem komórek i śmiertelnością z powodu tworzenia się lodu wewnątrzkomórkowego, toksyczności środka kriochronnego i odwodnienia przez szybką zmianę temperatury, szczególnie w strefie temperatur pośrednich, od  $-15^{\circ}\text{C}$  do  $-60^{\circ}\text{C}$  (Carvalho i in., 2008). Najczęściej stosowanym środkiem krioprotekcyjnym do przechowywania MSC, hematopetycznych komórek macierzystych (HSC) i embrionalnych komórek macierzystych jest dimetylosulfotlenek (Me2SO, dawny skrót DMSO). Stężenie Me2SO stosowanego w ogólnej kriokonserwacji komórek wynosi około 10% (v / v) pożytki do kriokonserwacji (Fleming i Hubel, 2006; Lee i in., 2005) z rampą chłodzenia ustawioną na  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  w urządzeniu do zamrażania z kontrolowaną szybkością, jak np. fryzjer. Pomyślnie przechowywanie MSC i HSC ze stosunkowo wyższą przeżywalnością po rozmrożeniu osiągnięto tradycyjną metodą kriokonserwacji (Fleming i Hubel, 2006; Lee i in., 2005), dlatego w niniejszym doświadczeniu pominięto mrożenie przy użyciu fryzjera. Zależało nam też na opracowaniu taniej i łatwo dostępnej techniki do wykorzystania przez różne podmioty w terenie. Trzeba również wspomnieć o działaniach niepożądanych Me2SO, takich jak nudności, dreszcze, niedociśnienie i zaburzenia rytmu serca u ludzi, zwłaszcza u dzieci poddanych infuzji HSC konserwowanych kriogenicznie za pomocą Me2SO (Zambelli i in., 1998). Dlatego całkowite usunięcie Me2SO z komórek jest bardzo ważne przed transfuzją, aby uniknąć toksycznych skutków ubocznych.

Niniejsze badanie przeprowadzono w celu wyboru optymalnej pożytki do kriokonserwacji MSCs z trzech stosowanych oraz optymalnej techniki mrożenia z dwóch obecnie stosowanych. Skuteczne jest stężenie 10% Me2SO w FBS. Pomimo działania cytotoksycznego i potencjalnie toksycznego dla pacjenta 10% Me2SO jest powszechnie stosowany jako środek krioprotekcyjny (Parody i in., 2013; Asghar i in., 2014; Lovelock i in., 1959). Ze względu na cytotoksyczność i różne raporty na temat skuteczności niższych stężeń Me2SO w kriokonserwacji ludzkich komórek, testowano 5% Me2SO (Balint i in., 1999; Berz i in., 2007). Niższe stężenie Me2SO może zminimalizować efekty toksyczne, które występują przed zamrożeniem oraz w okresie bezpośrednio po rozmrożeniu, kiedy MSC znajdują się w pożywce do kriokonserwacji. Badania na ludziach wykazały zmniejszoną toksyczność i lepszą wydajność MSC przy zmniejszonym stężeniu Me2SO (Carvalho i in., 2008; Rowley i in., 2003). Mitchell i in. (2015) stwierdzili, że 5% Me2SO jest wystarczającym krioprotektantem do krótkoterminowej kriokonserwacji MSC. Ock i Rho (2011) porównali najniższe stężenie 5% i najwyższe 20% Me2SO z tradycyjnie stosowanym stężeniem 10% Me2SO, aby zminimalizować toksyczność kriokonserwowanych pMSC. Zaobserwo-

wali oni, że wpływ 5% Me2SO był podobny do konwencjonalnego stężenia 10% w odniesieniu do przeżywalności, ekspresji genów związanych z apoptozą i zdolności do proliferacji pMSC w LN2 przez miesiąc. Nasze wyniki uzyskane na MSC świń i konia nie zgadzają się jednak z wnioskowaniem powyższych autorów. Faktem jest, że korzystanie z niższego stężenia Me2SO byłoby szczególnie ważne w sytuacjach, gdy płukanie MSC po rozmrożeniu byłoby opóźnione lub całkowicie pominięte przed zastosowaniem klinicznym (tj. wlew do pacjenta). Podatność wszystkich typów komórek na szok osmotyczny w trakcie rozmrożenia jest dobrze znana (Weiner i in., 1976; Ginis i in., 2012). Jednak zarówno brak zbilansowanego roztworu izotonicznego i/lub niższe stężenie krioprotektanta w pożywce do mrożenia np. 5% Me2SO może doprowadzić do zwiększonej podatności na działanie szoku osmotycznego. Nasze wyniki jednoznacznie pokazują że obniżenie stężenia do 5% wpływa negatywnie na konfluencję oraz jakość morfologiczną komórek w hodowli *in vitro*. Również obniżenie stężenia FBS i zastąpienie w części FBS przez pożywkę wpływa negatywnie na jakość komórek po rozmrożeniu, żywotność i konfluencję. Użycie 95% FBS było zatem w pewnym stopniu chroniące przed zwiększoną podatnością na szok osmotyczny w połączeniu z 5% Me2SO. Z punktu widzenia oceny morfologicznej komórek nie ma znaczenia lot Me2SO ani nawet data produkcji. Jednak wyniki oceny apoptozy zdają się temu przeczyć.

Istotną jest również sama technika mrożenia. Wyniki naszych badań są bardziej niekorzystne w przypadku stosowania dwustopniowej procedury mrożenia. Wyniki te u koni nie były tak jednoznaczne jak u świń, różnica osobnicza u tego gatunku jest znacznie bardziej widoczna, jednak ogólne wnioski w naszej ocenie pokrywają się u obu analizowanych gatunków. Mitchell i in. (2015) podają ciekawą obserwację. Otóż wykorzystali bardzo niewielkie różnice w procesie rozmrażania polegające na powolnym przenoszeniu kropli MSCs do dużej objętości DPBS (20 ml), zamiast stopniowego wprowadzania do DPBS przez ponad 5 minut, jak podano u Garvican i in. (2014). Ta niewielka różnica w metodzie rozmrażania spowodowała głębokie szkodliwe działanie pożywek do kriokonserwacji składających się z 95% surowicy o żywotności po rozmrożeniu mniejszej niż 60%.

W naszym doświadczeniu zaobserwowaliśmy również tendencję do stosunkowo wysokiego uszkodzenia błon komórkowych we wszystkich wariantach u świń, bo sięgającą od 36% do prawie 50%. U konia odsetki te były znacznie niższe, wynosiły tylko od 5% do 12,3%. Ponadto ocenę apoptozy wykonano tylko na MSC świń i otrzymane dane wskazały na wpływ daty produkcji Me2SO lub lot produkcji. W przypadku mrożenia w 5% ME2SO (świeży odczynnik) w FBS odnotowano najniższy odsetek komórek apoptotycznych, a najwyższy w wariantach 1 i 2 czyli 10% i 5% ME2SO (stary odczynnik) w FBS. Nie znaleźliśmy w dostępnej literaturze podobnych prac doświadczalnych. Temat apoptozy podjęli Ginis i in. (2012), którzy sugerowali, że zatrzymanie wzrostu MSC po rozmrożeniu może być wynikiem indukowania apoptozy w „słabszych” MSC po rozmrożeniu. Z kolei Mitchell i in. (2015) pływające w pożywce komórki po rozmrożeniu nazwali apoptotycznymi MSC, przetrwałymi, ale dysfunkcyjnymi komórkami. Według nich zahamowanie wzrostu obserwowane po rozmrożeniu wydawało się cofać między 24. i 72. godziną hodowli, jednak „wyleczenie” części MSC z apoptozy było niepełne, ponieważ całkowita liczba żywych

komórek 72 godziny po rozmrożeniu była znacznie niższa, niż można by się spodziewać, biorąc pod uwagę dane dotyczące prawidłowej niemrożonej generacji komórkowej. Co ciekawe, wzrost w okresie 72 godzin po rozmrożeniu był znacznie szybszy niż obserwowany podczas rutynowej hodowli *in vitro* świeżych MSC. Dane te są sprzeczne z innym doniesieniem, w którym raportowano stały wskaźnik proliferacji MSC przez 4 dni po rozmrożeniu (Garvican i in., 2014).

Reasumując, zalecamy mrożenie MSCs koni i świni w 10% Me2SO w FBS w pudełku do mrożenia Mr. Frosty.

### Piśmiennictwo

- Alberton P., Popov C., Prägert M., Kohler J., Shukunami C., Schieker M., Dochewa D. (2012). Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis. *Stem Cells Dev.*, 21: 846–858.
- Asghar W., El Assal R., Shafiee H., Anchan R.M., Demirci U. (2014). Preserving human cells for regenerative, reproductive and transfusion medicine. *Biotechnol J.*, 9: 895–903.
- Balint B., Ivanovic Z., Petakov M., Taseski J., Jovčić G., Stojanović N., Milenković P. (1999). The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplant.*, 23: 613–619.
- Berz D., McCormack E.M., Winer E.S., Colvin G.A., Quesenberry P.J. (2007). Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am. J. Hematol.*, 82: 463–472.
- Carvalho K.A., Cury C.C., Oliveira L., Cattaned R.I., Malvezzi M., Francisco J.C., Pachalok A., Olandoski M., Faria-Neto J.R., Guarita-Souza L.C. (2008). Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency. *Transplant. Proc.*, 40 (3): 839–841.
- Fang D., Seo B.M., Liu Y., Sonoyama W., Yamaza T., Zhang C., Wang S., Shi S. (2007). Transplantation of mesenchymal stem cells is an optimal approach for plastic surgery. *Stem Cells*, 25 (4): 1021–1028.
- Fleming K.K., Hubel A. (2006). Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. *Transfus. Apher. Sci.*, 34 (3): 309–315.
- Garvican E.R., Cree S., Bull L., Smith R.K., Dudhia J. (2014). Viability of equine mesenchymal stem cells during transport and implantation. *Stem Cell Res. Ther.*, 5: 94.
- Ginis I., Grinblat B., Shirvan M.H. (2012). Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. *Tissue Eng. Part C Methods.*, 18: 453–463.
- Gulotta L.V., Chaudhury S., Wiznia D. (2012). Stem cell for augmenting tendon repair. *Stem Cell Int.*, 2012: 291431.
- Gurgul A., Opiela J., Pawlina K., Szmatoła T., Bochenek M., Bugno-Poniewierska M. (2017). The effect of histone deacetylase inhibitor trichostatin A on porcine mesenchymal stem cell transcriptome. *Biochimie*, 139: 56–73.
- Gurgul A., Romanek J., Pawlina-Tyszko K., Szmatoła T., Opiela J. (2018). Evaluation of changes arising in the pig mesenchymal stromal cells transcriptome following cryopreservation and Trichostatin A treatment. *PLoS ONE*, 13 (2): e0192147.
- Janz F. de L., Debes A. de A., Cavaglieri R. de C., Duarte S.A., Romão C.M., Morón A.F., Zugaib M., Bydlowski S.P. (2012). Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. *J. Biomed Biotechnol.*, 2012: 649353.
- Jiong C., Jiake C., Chunmao H., Yingen P., Qiuhe W., Zhouxi F., Xiangsheng F. (2010). Clinical application and long-term follow-up study of porcine acellular dermal matrix combined with autografting. *J. Burn Care Res.*, 31(2): 280–285.
- Khan W.S., Johnson D.S., Hardingham T.E. (2010). The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. *The Knee*, 17: 369–374.

- Khojasteh A., Behnia H., Hosseini F.S., Dehghan M.M., Abbasnia P., Abbas F.M. (2013). The effect of PCL-TCP scaffold loaded with mesenchymal stem cells on vertical bone augmentation in dog mandible: a preliminary report. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 101 (5): 848–854.
- Lee M.W., Yang M.S., Park J.S., Kim H.C., Kim Y.J., Choi J. (2005). Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Int. J. Hematol.*, 81 (2): 126–130.
- Lovelock J.E., Bishop M.W. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183: 1394–1395.
- Middelkoop E., van den Bogaerd A.J., Lamme E.N., Hoekstra M.J., Brandsma K., Ulrich M.M. (2004). Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. *Biomaterials*, 25 (9): 1559–1567.
- Mitchell A., Rivas K.A., Smith R. 3rd., Watts A.E. (2015). Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95% autologous serum and 5% DMSO does not alter post-thaw growth or morphology *in vitro* compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95% and DMSO at 10 or 5. *Stem Cell Res. Ther.*, Nov 26, 6: 231.
- Moon J.H., Lee J.R., Jee B.C., Suh C.H.S., Kim S.H., Lim H.J., Kimet H.K. (2008). Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum. Reprod.*, 23(8): 1760–1770.
- Motlík J., Klíma J., Dvořánková B., Smetana Jr. K. (2007). Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. *Theriogenology*, 67 (1): 105–111.
- Ock S.A., Rho G.J. (2011). Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). *Cell Transplant.*, 20 (8): 1231–1239.
- Opiela J., Lipinski D., Romanek J., Juzwa W., Bochenek M., Wilczek P. (2016). MMP-2, TIMP-2, TAZ and MEF2a transcript expression in osteogenic and adipogenic differentiation of porcine mesenchymal stem cells. *Ann. Anim. Sci.*, 16 (2): 369–385.
- Ozkavukcu S., Erdemli E. (2002). Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*, 24 (4): 187–196.
- Parody R., Caballero D., Marquez-Malaver F.J., Vazquez L., Saldana R., Madrigal M.D., Calderón C., Carrillo E., Lopez-Corral L., Espigado I., Carmona M., López-Villar O., Pérez-Simón J.A. (2013). To freeze or not to freeze peripheral blood stem cells prior to allogeneic transplantation from matched related donors. *Eur. J. Haematol.*, 91: 448–455.
- Phadke A., Hwang Y., Kim S.H., Kim S.H., Yamaguchi T., Masuda K., Varghese S. (2013). Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur. Cell Mater.*, 25: 114–128.
- Poncellet A.J., Vercruyse J., Saliez A., Gianello P. (2007). Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic *in vitro*, intracardiac injection elicits an immune response *in vivo*. *Transplantation*, 83 (6): 783–790.
- Rowley S.D., Feng Z., Chen L., Holmberg L., Heimfeld S., MacLeod B., Bensinger W.I. (2003). A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. *Bone Marrow Transplant.*, 31(11): 1043–1051.
- Syme R., Bewick M., Stewart D., Porter K., Chadderton T., Gluck S. (2004). The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 10 (2): 135–141.
- Tsai C.C., Huang T.F., Ma H.L., Chiang E.R., Hung S.C. (2013). Isolation of mesenchymal stem cells from shoulder rotator cuff: potential source for muscle and tendon repair. *Cell Transplant.*, 22: 413–422.
- Weiner R.S., Tobias J.S., Yankee R.A. (1976). The processing of human bone marrow for cryopreservation and reinfusion. *Biomedicine*, 24: 226–231.
- Winkler T., von Roth P., Radojewski P., Urbanski A., Hahn S., Preininger B., Duda G.N., Perka C. (2012). Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats. *J. Tissue Eng. Regen Med.*, 6 Suppl., 3: 60–67.
- Xiang Y., Zheng Q., Jia B., Huang G., Xie C., Pan J., Wang J. (2007). Ex vivo expansion,

adipogenesis and neurogenesis of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Int.*, 31(5): 444–450.

Zambelli A., Poggi G., Da Prada G., Pedrazzoli P., Cuomo A., Miotti D., Perotti C., Preti P., Robustelli della Cuna G. (1998). Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res.*, 18(6B): 4705–4708.

Zatwierdzono do druku: 27 IV 2021

JOLANTA OPIELA, JOANNA JURKIEWICZ, LECHOSŁAW GAJDA,  
AGNIESZKA WIERZCHOŚ-HILCZER

**Development of cryopreservation conditions for heterogeneous mesenchymal stem cells (MSCs)  
isolated from pig and horse bone marrow**

SUMMARY

We evaluated the short-term cryopreservation of equine and porcine bone marrow-derived MSCs in solutions differing in concentrations of  $ME_2SO$  and production date, and compared two freezing techniques. Medium with lower concentration of cryoprotectant is clinically desirable to streamline clinical and laboratory procedures by use of cryopreserved MSCs. Unfortunately, according to our results decreasing the  $ME_2SO$  concentrations from 10% to 5% causes negative effects and therefore is not recommended. A low-tech, commercially available freezing system that would be affordable in veterinary services was proposed.

Key words: MSC, horse, pig, freezing,  $ME_2SO$