

# Mesenchymal stem cells: multilayer polyelectrolyte microcapsules uptake, toxicity and influence upon functional properties

K. V. Lepik<sup>1</sup>, V. S. Sergeev<sup>1</sup>, A. R. Muslimov<sup>1</sup>, D. S. Romanyuk<sup>1</sup>, R. T. Mikhelashvili<sup>1</sup>, I. S. Moiseev<sup>1</sup>, E. V. Popova<sup>2</sup>, I. L. Radchenko<sup>2</sup>, A. D. Vilesov<sup>1</sup>, G. B. Sukhorukov<sup>2,3</sup>, B. V. Afanasyev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russia.

<sup>2</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, RASA-center, Russia,

<sup>3</sup> Queen Mary University of London, UK

Contact: Dr. Kirill V. Lepik, The First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russia.

E-mail: lepikv@gmail.com

## Introduction

Multilayer polyelectrolyte microcapsules are gathering an increasing interest as novel mean for drug delivery, a diagnostic and investigational tool. The main advantages of these microcapsules are their well-controlled size and shape, finely tuned wall thickness, and variable wall compositions enabling controlled release of their content via magnetic field, light and/or ultrasound exposure. Ease of surface modification allows further functionalization of the microcapsules. At this point, mesenchymal stem cells (MSCs) represent a popular cell model in the wide range of clinical and scientific trials. Currently, there is a lack of data concerning efficiency of microcapsules uptake by the MSCs, and their influence on functional properties of these cells.

## Materials and methods

Bone marrow-derived MSCs were isolated using a standard operating procedure. The cells harvested from the second and third passages were used for further experiments. The study included two main sections: in the first arm, a suspension of magnetic PAH/PSS FITC-labeled microcapsules (3-5  $\mu\text{m}$  in size) were added to the surface-adhered MSCs at the cell/particle ratios of 1:1, 1:5, 1:10, 1:20. In the second arm, the same preparations of microcapsules were added to the MSC suspensions at the same ratios. After 24 h of incubation, the uptake rates were tested by means of confocal microscopy and flow cytometry. Cell morphology and viability was tested by differential counting in haemocytometer using trypan blue and propidium iodide vital dyes. Differentiation capacity of the cells was tested using standard staining for osteogenic and adipogenic differentiation. Magnetic separation of MSCs bound with magnetic-labeled microcapsules was tested using midiMACS cell separation system. Adhesive properties of MSCs were tested as follows: MSC associated with microcapsules at the ratios of 1:5; 1:10; 1:20 were seeded into

the cultural flasks at the concentrations of  $20 \times 10^4/\text{cm}^2$  under standard conditions. After 24-h incubation, the culture medium was removed, adherent cells were detached with trypsin/EDTA. Both suspension and adherent cell fraction were counted by means of haemocytometer and normalized against a control group (without microcapsules).

## Results

The cell-capsule association rates correlate with numbers of added capsules and the method applied. Average proportion of adherent cells associated with microparticles is, respectively, 8% (at 1:1 cell/capsule ratio); 18% (1:3 ratio) 32% (1:10 ratio). Similar testing of MSC/particle contacts in suspension phase yielded more impressive results: 90% at the 1:1 ratio; 98% (1:3 ratio); 99% (1:10 ratio). Single cells are able to capture up to 30 microcapsules (at 1:20 cell/capsule ratio). Further increase of the microcapsule concentrations do not lead to significant enhance of their uptake by the cells. A lesser part of capsules are only associated with membrane, but not internalized by cells. Following internalization, the microcapsules are dispersed in cytoplasm, mainly, in the perinuclear compartment. Mean percentage of viable cells after 24 h of incubation of MSCs with microcapsules, normalized for the control group results, was 90% (at the 1:5 cell/capsule ratio); 85% (1:10); 83% (1:20 ratio), 5% (1:100 ratio). The cells, associated with microcapsules can be isolated with high efficiency by routine magnet separation methods. The ability of MSCs for osteogenic and adipogenic differentiation was not significantly affected by the microcapsules uptake. Conclusion. Adhesion assay has shown that adherent fraction of the culture-plated cells treated with capsules was significantly decreased in dose-dependent manner, i. e., average percentage of adherent cells was 85% (1:5 ratio); 64% (1:10 ratio); and 38% (1:20 ratio), in comparison with 85% adherence in untreated control group.

## Conclusions

Polyelectrolyte microcapsules can be internalized by MSCs at a high efficiency. Cell suspension provides optimal conditions for effective capsule uptake. Polyelectrolyte microcapsules show very mild toxicity and only minimally influence cell functions under the cell:capsule ratio of <1:10. A significant decrease in cell viability was observed only in experiments with very high (1:100+) cell/capsule ratio. The ability of MSCs for osteogenic and adipogenic differentiation was not impaired by the microcapsules uptake. Adherent fraction of the plated capsule-exposed cells was significantly de-

creased in a dose-dependent manner. Ingestion of microcapsules at high amounts causes inhibition of MSCs adherence. Polyelectrolyte microcapsules may be considered a promising tool for diagnostics, therapeutic interventions and investigational approaches, due to potential ability of controlled cell delivery using external magnetic fields.

## Keywords

Mesenchymal stem cells, adherence, differentiation, polyelectrolyte microcapsules, internalization.

# Мезенхимные стволовые клетки: захват, токсичность и влияние на функциональные свойства многослойных полиэлектролитных микрокапсул

К. В. Лепик<sup>1</sup>, В. С. Сергеев<sup>1</sup>, А. Р. Муслимов<sup>1</sup>, Д. С. Романюк<sup>1</sup>, Р. Т. Михелашвили<sup>1</sup>, И. С. Моисеев<sup>1</sup>, Е. В. Попова<sup>2</sup>, И. Л. Радченко<sup>2</sup>, А. Д. Вилесов<sup>1</sup>, Г. Б. Сухоруков<sup>2,3</sup>, Б. В. Афанасьев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт детской гематологии, онкологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Политехнический Университет имени Петра Великого, Россия

<sup>3</sup> Лондонский университет королевы Марии, Великобритания

## Введение

Многослойные полиэлектролитные микрокапсулы привлекают все больший интерес как перспективное средство доставки лекарственных веществ, диагностический и исследовательский инструмент. Основными преимуществами подобных микрокапсул является контролируемый размер и форма, толщина и структура оболочек, позволяющих осуществлять контролируемую доставку содержимого посредством магнитного поля, светового излучения или ультразвуковых волн, а также легкость функционализации поверхности капсулы. В настоящий момент, мезенхимные стволовые клетки (МСК), являются одной из наиболее популярных клеточных популяций в широком диапазоне клинических и научных исследований. Однако, данные об эффективности захвата капсул, а также их влиянии на функциональные свойства клеток данного типа в настоящий момент отсутствуют.

## Материалы и методы

Получение МСК из костного мозга здоровых доноров и их экспансия осуществлялась согласно стандартному протоколу. Для экспериментов использовались клетки второго и третьего пассажа. В исследование включено

две основных ветви в зависимости от состояния клеток, к которым добавлялась суспензия 5 мкм PAH /PSS магнитных полиэлектролитных микрокапсул, меченых FITC. В первой суспензия микрокапсул добавлялась к адгезированным на поверхности культурального пластика клеткам в соотношении 1:1, 1:5, 1:10, 1:20. Во второй смешивались суспензии микрокапсул и МСК в тех же соотношениях. После 24 часов инкубирования, эффективность захвата оценивалась при помощи конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Морфология клеток и жизнеспособность оценивалась с использованием гемоцитометра и витальных красителей трипанового синего/пропидия йодида. Способность к дифференцировке была исследована с использованием стандартных протоколов цитодифференцировки МСК в остеогенном и адипогенном направлении. Магнитная сепарация клеток, ассоциированных с магнитными микрокапсулами производилась с использованием системы midiMACS. Адгезионные свойства МСК оценивались следующим образом: МСК ассоциированные с капсулами в соотношениях 1:5 1:10 1:20 рассеивались на культуральные флаконы в концентрации  $20 \times 10^4 / \text{см}^2$  при стандартных условиях. После 24 часов инкубирования кондиционная среда удалялась, адгезированные клетки удалялись путем трипсинизации. Суспензионная и адгезионная фракции подсчитывались с использованием гемоцитометра.

## Результаты

Эффективность ассоциации клеток и микрокапсул коррелируют с числом добавленных капсул и используемым методом. Средний процент клеток ассоциированных с микрокапсулами при их добавлении в адгезионную культуру 8% (при соотношении клетки/капсулы 1:1) 18% (1:3) 32% (1:10); при добавлении к МСК в суспензионной форме 90% (1:1) 98% (1:3) 99% (1:10). Одиночные клетки показывают способность к захвату до 30 микрокапсул. Меньшая часть капсул ассоциирована с клеточной мембраной, но не интернируется клеткой. После интернализации микрокапсулы диспергируются в цитоплазме, главным образом в перинуклеарном компартменте клетки. Средний процент жизнеспособных клеток после инкубации с микрокапсулами в течении 24 часов, нормализованный относительно клеток контрольной группы составили 90% (при соотношении клетки/капсулы 1:5), 85% (1:10), 83% (1:20), 5% (1:100). Клетки ассоциированные с магнитными микрокапсулами могут быть с высокой эффективностью изолированы при помощи рутинных методов магнитной сепарации. Способность МСК остеогенной и адипогенной дифференцировке значимо не изменилась с захватом микрокапсул. Анализ адгезионной активности продемонстрировал что адгезионная фракция значимо уменьшалась с увеличением соотношения клеток и микрокапсул. Средний процент адгезионных клеток составил 85% в группе (1:5), 64% (1:10), 38% (1:20) по сравнению с 85% в контрольной группе.

## Выводы

Полиэлектролитные микрокапсулы могут быть захвачены МСК с высокой эффективностью. Оптимальные условия для захвата микрокапсул – клеточная суспензия. Полиэлектролитные капсулы демонстрируют незначительную цитотоксичность и влияние на клеточные функции при умеренном соотношении клетки:микрокапсулы (<1:10). Критическое снижение жизнеспособности клеток наблюдалось только к группе крайне высокого (1:100+) соотношения. Способность МСК остеогенной и адипогенной дифференцировке значимо не изменилась с захватом микрокапсул. Адгезионная способность МСК снижалась в зависимости от дозы добавленных микрокапсул. Захват большого числа микрокапсул снижает адгезионные способности МСК. Полиэлектролитные микрокапсулы – перспективный инструмент доставки клеток и лекарственных средств, с возможностью внешнего контроля посредством магнитного поля.

## Ключевые слова

Мезенхимные стволовые клетки, адгезия, дифференцировка, микрокапсулы полиэлектролитные, интернализация.