

Изучение криочувствительности мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер

UDC 576.371:612.419:57.085.23:57.043

A.I. PRAVDYUK*, YU.A. PETRENKO, V.S. KHOLODNYI, V.P. GRISCHUK, A.YU. PETRENKO

Cryosensitivity of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated in Alginate Microbeads

Трёхмерное культивирование мезенхимальных стромальных клеток (МСК), инкапсулированных в альгинатные микросферы, является перспективным направлением клеточной биологии и тканевой инженерии, что определяет необходимость разработки методов их низкотемпературного консервирования. В работе показана возможность криоконсервирования МСК в составе альгинатных микросфер путем медленного замораживания под защитой ДМСО. Сравнительное изучение МСК в составе альгинатных микросфер и в виде суспензии одиночных неинкапсулированных клеток при криоконсервировании под защитой 10% ДМСО не выявило существенных различий их криочувствительности, а в присутствии 5% они имели более низкие показатели жизнеспособности. Значения сохранности и метаболической активности после криоконсервирования МСК в составе альгинатных микросфер увеличивались при повышении концентрации ДМСО с 5 до 10%. Инициация кристаллизации в ходе медленного программного замораживания МСК в составе альгинатных микросфер в присутствии 10% ДМСО позволяла добиться максимальных значений сохранности и метаболической активности инкапсулированных клеток. Результаты работы могут быть использованы для создания банка МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы.

Ключевые слова: альгинатные микросферы, мезенхимальные стромальные клетки, инкапсуляция, криоконсервирование.

Тривимірне культивування мезенхімальних стромальних клітин (МСК), які інкапсульовані у альгінатні мікросфери, є перспективним напрямком клітинної біології та тканинної інженерії, що визначає необхідність розробки методів їхнього низькотемпературного консервування. У роботі показана можливість криоконсервування МСК у складі альгінатних мікросфер шляхом повільного заморожування під захистом ДМСО. Порівняльне вивчення МСК у складі альгінатних мікросфер і у вигляді суспензії поодиноких неінкапсульованих клітин при криоконсервуванні під захистом 10% ДМСО не виявило значних розбіжностей їх криочувствитості, а у присутності 5% ДМСО вони мали більш низькі показники життєздатності. Показники збереженості і метаболічної активності після криоконсервування МСК у складі альгінатних мікросфер збільшувались при підвищенні концентрації ДМСО з 5 до 10%. Ініціація кристалізації при повільному програмному заморожуванні МСК у складі альгінатних мікросфер у присутності 10% ДМСО дозволила отримати максимальні показники збереженості і метаболічної активності інкапсульованих клітин. Результати роботи можуть бути використані для створення банку МСК, які інкапсульовані у альгінатні мікросфери.

Ключові слова: альгінатні мікросфери, мезенхімальні стромальні клітини, інкапсуляція, криоконсервування.

Three-dimensional culture of mesenchymal stromal cells (MSC), encapsulated in alginate microbeads is a perspective direction of cell biology and tissue engineering, indicating the need of the development of their low temperature preservation methods. The study describes the possibility of cryopreservation of MSC within alginate microbeads by slow cooling under protection of DMSO. Comparison study of MSC within alginate microbeads and as non-encapsulated cell suspension during cryopreservation under protection of 10% DMSO did not show significant differences in cells' cryosensitivity, while during cryopreservation with 5% DMSO encapsulated MSC had lower viability values. Survival and metabolic activity of MSC after cryopreservation within alginate microbeads depended on DMSO concentration in cryoprotective medium and rised with increase of DMSO concentration from 5% to 10%. Initiation of crystallization during slow program cooling under protection of 10% DMSO allowed to achieve maximal values of survival and metabolic activity of encapsulated cells. The results of this study could be used for the banking of MSC encapsulated into alginate microbeads.

Key words: alginate microbeads, mesenchymal stromal cells, encapsulation, cryopreservation.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают уникальной способностью к самообновлению и мультилинейной дифференцировке в клетки костной, хрящевой, мышечной, жировой и других тканей *in vivo* и *in vitro* [2, 7, 19]. Они имеют высокий пролиферативный потенциал, хорошо адгезируют на культуральный пластик, демон-

Mesenchymal stromal cells (MSC) have unique capacity to self-renewal and multilineage differentiation into cells of bone, cartilage, muscle, fat and other tissues *in vivo* and *in vitro* [2, 7, 19]. They have a high proliferative potential, adhere well to cultural plastic, and demonstrate fibroblast-like morphology when culturing in monolayer. These properties make

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
pravduke@yandex.ru

* To whom correspondence should be addressed: 23,
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373
3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: pravduke@yandex.ru

стрируют фибробластоподобную морфологию при культивировании в монослое. Эти свойства делают МСК привлекательным объектом для тканевой инженерии и регенеративной медицины [29].

Монослойное культивирование является классическим методом изучения клеток животных, в том числе и МСК. Однако в этой системе ряд условий отличается от тех, в которых клетки находятся в организме. Так, в монослое для МСК доступно только двухмерное пространство, тогда как в естественных условиях – трехмерное. Альтернативный подход основан на культивировании клеток в трехмерном пространстве, что позволяет выявить такие их свойства, которые не проявляются в монослое [8, 9]. Это объясняется тем, что форма клеток определяет их функциональное состояние и поведение, в том числе способность определенным образом реагировать на сигнальные воздействия [22]. Например, установлено, что форма МСК – один из триггеров, определяющих их способность дифференцироваться в клетки хряща либо гладкой мускулатуры [10].

Одним из перспективных методов объемного культивирования является инкапсуляция клеток в микросферы, состоящие из различных гидрогелей, среди которых наибольшее распространение получили альгинатные микросферы (АМС). Благодаря своей структуре альгинатные гидрогели позволяют диффундировать кислороду, питательным веществам, сигнальным молекулам, что обеспечивает жизнеспособность и функциональную активность инкапсулированных клеток [11]. При этом альгинатный гель обладает барьерными функциями по отношению к иммуноглобулинам и молекулам с массой свыше 100 кДа. Это позволяет использовать данный биоматериал для иммуноизоляции клеток [17]. Кроме того, биоинертность альгината и возможность модификации его структуры биологически активными молекулами делают его привлекательным для изучения взаимосвязи между адгезией МСК и их способностью к пролиферации и дифференцировке [4, 30]. Существенным преимуществом альгината перед другими биоматериалами для инкапсуляции является возможность его деполимеризации, что позволяет легко извлекать инкапсулированные клетки [16, 28].

Благодаря совокупности свойств система “МСК – альгинатный гидрогель” представляет большой интерес как для теоретических исследований по клеточной биологии, так и для практического использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Для изучения свойств МСК, инкапсулированных в АМС, необходимы создание банка этих культур и разработка эффективных методов их криоконсервирования.

MSC the attractive object for tissue engineering and regenerative medicine [29].

Monolayer culture is the classic method to study animal cells, including MSC. However in this system several conditions are different from those the cells are in an organism. For example, monolayer culture presents only 2D space for MSC, while under natural conditions the 3D is affordable. Alternative approach is based on cell culturing in 3D space that enables to reveal the properties, being not manifested in monolayer culture [8, 9]. This comes from the fact that shape determines cells' functional state and behavior, including ability to respond the signals in a certain way [22]. Among other things, the shape of MSC was found to trigger their ability to differentiate into cartilage or smooth muscle cells [10].

One of the perspective methods of 3D culturing is cell encapsulation into microbeads, composed of various hydrogels among which the most widespread are the alginate microbeads (AMB). Due to their structure the alginate hydrogels enable oxygen, nutrients as well as signal molecules to diffuse, providing viability and functional activity of the encapsulated cells [11]. Herewith the alginate gel possesses the barrier functions in relation to immunoglobulins and molecules with mass more than 100 kDa. This enables the use of this biomaterial for cell immune isolation [17]. Furthermore alginate is bioinert and can be modified with bioactive molecules that makes it attractive for study of the interaction between adhesion of MSC and their capacity to proliferate and differentiate [4, 30]. Alginate's essential advantage among other biomaterials for encapsulation is the ability to depolymerize, enabling to release the encapsulated cells easily [16, 28].

Due to the sum total of properties the ‘MSC – alginate hydrogel’ system is of great interest not only for theoretical researches in cell biology, but also for practical application in tissue engineering and regenerative medicine.

To study the properties of MSC, encapsulated in AMB it is necessary to bank these cultures and develop the effective methods of their cryopreservation.

Technologies developed for cell suspension cryopreservation might be not applicable for cells encapsulated in AMB. Probably this is caused by changes in the rate of water and cryoprotectants' distribution between cells and medium under freeze-thawing conditions. During cryopreservation of cells within AMB it should be taken into account that the protocols have to provide both preservation of morphofunctional properties of cells, and structure integrity of the carrier, which mechanical damage unavoidably results in a death of encapsulated cells.

For cryopreservation of MSC the slow freezing in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO) cryo-

Технологии, разработанные для криоконсервирования клеточных суспензий, могут оказаться не применимыми для клеток в составе АМС. Возможно, это обусловлено изменением скорости распределения воды и криопротекторов между клетками, а также средой при замораживании-отогреве. В процессе криоконсервирования клеток в составе АМС необходимо учитывать, что протоколы должны обеспечивать не только сохранение морфофункциональных свойств клеток, но и структурную целостность носителя, механическое повреждение которого неизбежно приводит к гибели инкапсулированных в них клеток.

Для криоконсервирования МСК обычно применяют медленное замораживание в присутствии криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрациях 5–10% [12, 18, 20, 31]. Однако вопрос об эффективности такого протокола для криоконсервирования МСК в составе АМС остается малоизученным. Кроме того, показано, что альгинатный гидрогель обладает криозащитными свойствами при быстром замораживании инкапсулированных гепатоцитов [5, 15]. В связи с этим также представляет интерес изучение криочувствительности МСК в составе АМС при использовании высоких скоростей замораживания.

Цель работы – сравнительное изучение влияния быстрого и медленного замораживания под защитой ДМСО на сохранность и метаболическую активность МСК, инкапсулированных в АМС, и в виде суспензии одиночных клеток.

Материалы и методы

В работе использовали МСК, выделенные из мезодермально-мезенхимальных тканей плодов человека по [1], после экспансии в селективной среде в течение 6–8 пассажей.

Клетки культивировали в монослое в культуральных сосудах с площадью поверхности 25 см² (“Nunc”, США) в среде α -MEM (“Sigma”, США), дополненной 15% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота (“Биолот”, Россия), 100 ед. пенициллина, 100 мкг стрептомицина, при 37°C и 95%-й влажности в атмосфере с 5% CO₂.

При достижении 60–70% конfluence клетки снимали с субстрата при помощи смеси трипсин-версена (1:4) по стандартной методике [24] и пересевали с коэффициентом 1:2. Питательную среду меняли каждые 3-е суток.

Перед инкапсуляцией клетки снимали, как описано выше, осаждали путем центрифугирования при 700 об/мин в течение 5 мин, промывали средой с 0,15 М NaCl и 25 мМ HEPES (pH 7,4) и ресуспендировали в 1,2%-м растворе альгината натрия. Полученную суспензию с концентрацией 1,2–1,6×10⁶ клеток/мл помещали в стерильный шприц

protectant in 5–10% concentration is usually applied [12, 18, 20, 31]. However the question whether this protocol is effective enough to cryopreserve the MSC within AMB remains open. In addition it has been shown that alginate hydrogel has cryoprotective properties during rapid freezing of encapsulated hepatocytes [5, 15]. That is why the cryosensitivity of MSC within AMB during application of high freezing rates is also of interest.

The research aim is to study the effect of rapid and slow freezing under DMSO protection on viability and metabolic activity of MSC, encapsulated in AMB as well as in the form of single cell suspension.

Materials and methods

For this study the MSC were isolated from mesodermal-mesenchymal tissues of human fetuses as reported previously [1] and expanded in selective medium during 6–8 passages.

The cells were cultured in monolayer in culture tubes (Nunc) with 25 cm² surface in α -MEM (Sigma) medium, enriched with 15% fetal bovine serum (FS, Biolog), 100 IU of penicillin, 100 mg of streptomycin, at 37°C and 95% humidity in 5% CO₂ atmosphere.

When reaching the 60–70% confluent the cells were detached from the substrate by trypsin-versene mixture (1:4) according to the standard method [24] and replated in 1:2 ratio. The nutrient medium was changed each 3rd day.

Prior to encapsulation the cells were detached, as described above, sedimented at 700 rpm for 5 min, washed by medium with 0.15 M NaCl and 25 mM HEPES (pH 7,4) and resuspended in 1.2% sodium alginate solution. The obtained suspension in concentration 1.2–1.6×10⁶ cells/ml was placed into sterile 2 ml syringe and sprayed with specially designed nozzle into the solution, containing 100 mM CaCl₂. Alginate microbeads with cells were kept in CaCl₂ for 10 min for polymerization, and then stepwise washed from excessive calcium ions by the medium with 0.15 M NaCl and 25 mM HEPES. The described method enabled to obtain microbeads with the dimensions of 500 to 1,000 μ m.

Cryoprotective medium consisted of medium 199 with 10% FS and DMSO of 5 or 10% final concentrations. The medium, containing double concentration of DMSO and FS was slowly dropwise added into the equal volume of culture medium with MSC, and after 15 min equilibration at 4°C the samples were frozen in 1 ml cryotubes (Corning). The freezing was carried out by three regimens: 1 – one step rapid freezing by direct plunging into liquid nitrogen; 2 – two step slow freezing with 1°C/min rate down to –80°C with further plunging into liquid nitrogen; 3 – three step slow freezing with 1°C/min rate from 0 down to –40°C with initiation of crystallization at

объемом 2 мл и с помощью специально сконструированной насадки распыляли в раствор, содержащий 100 мМ CaCl₂. Альгинатные микросферы с клетками оставляли в растворе CaCl₂ на 10 мин для полимеризации, после чего проводили ступенчатую отмывку от избытка ионов кальция раствором 0,15 М NaCl и 25 мМ HEPES. Описанный способ позволял получать микросферы с размерами в диапазоне 500–1000 мкм.

В качестве криозащитной среды использовали среду 199 с 10% ЭС и ДМСО в конечной концентрации 5 или 10%. Среду, содержащую двойную концентрацию ДМСО и ЭС, медленно по каплям добавляли в равный объем культуральной среды, содержащей МСК, и после эквilibрации в течение 15 мин при температуре 4°C замораживали в криопробирках (“Corning”, США) объемом 1 мл. Замораживание проводили по трем режимам: режим 1 – быстрое одноэтапное замораживание путем прямого погружения в жидкий азот; режим 2 – медленное двухэтапное замораживание со скоростью 1 С°/мин до –80°C с последующим погружением в жидкий азот; режим 3 – медленное трехэтапное замораживание со скоростью 1°C/мин от 0 до –40°C с инициацией кристаллизации при –6,3°C, затем со скоростью 10°C/мин от –40 до –80°C с последующим погружением в жидкий азот.

Образцы хранили при –196°C, отогревали на водяной бане при 37°C. Криопротектор удаляли медленным разведением деконсервированной суспензии средой 199 с 10% ЭС в соотношении 1:10, затем центрифугировали при 200 г в течение 10 мин.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью комбинированного окрашивания флуоресцентными красителями флуоресцеин диацетатом (ФДА) и этидиум бромидом (ЭБ) [6]. Включение флуоресцентного красителя в клетки (в составе АМС и суспензии) определяли с помощью инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения LSM 510 ver. 4.2 (Carl Zeiss, Германия). Изображения получали при длине волны возбуждения 488 нм (аргоновый лазер, рабочая мощность 5,4 мВт) с использованием объектива EC Plan Neofluar ×10 и фильтра HFT 405/488/543/633 в трех каналах: в первом регистрировали эмиссию в диапазоне 508–550 нм, во втором – эмиссию в диапазоне 593–646 нм, в третьем – видимое изображение в проходящем свете. Величина лазерной апертуры (*pinhole*) составляла 150 нм. Конфокальные изображения АМС с шагом по оси *z* получали с интервалом 10 мкм. Для подсчета количества окрашенных клеток строили с помощью программного обеспечения LSM 510 ver. 4.2 трехмерные проекции и

–6.3°C, then with 10°C/min rate from –40 down to –80°C with further plunging into liquid nitrogen.

The samples were stored at –196°C, thawed in water bath at 37°C. Cryoprotectant was removed by slow dilution of frozen-thawed suspension with medium 199 contained 10% FS in the 1:10 ratio, then centrifuged at 200 g for 10 min.

Cell viability was estimated by combined staining by fluorescent dyes, fluorescein diacetate (FDA) and etidium bromide (EB) [6]. Inclusion of fluorescent dye into cells (within AMB and in suspension) was investigated by inverted confocal laser scanning microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) and LSM 510 ver. 4.2 (Carl Zeiss, Germany) software. Images were obtained at excitation wave length of 488 nm (argon laser, operating power 5.4 mW) with EC Plan Neofluar ×10 objective and HFT 405/488/543/633 filter in three channels: in the first one the emission within the range of 508–550 nm was detected; the emission within the range of 593–646 nm in the second channel and in the third one the transmitted light image was recorded. The pinhole was 150 nm. The *z* stacks of confocal images of AMB were obtained with 10 μm step. 3D rendering and sum projections of all obtained layers along the *z* axis were obtained by LSM 510 ver. 4.2 (Carl Zeiss, Germany) software and used to calculate the quantity of stained cells.

The Alamar blue (AB) test was used to estimate the metabolic and proliferative activity in MSC [25]. Cells in single cell suspension or within the alginate microbeads were cultured in the medium, containing 10% of redox indicator AB (Serotec) for 12 hrs in 24 well plates (Nunc). Thereafter the fluorescence intensity of reduced redox-indicator in culturing medium was measured using Tecan plate spectrophotofluorometer. Background was the cell free medium with indicator. The reduction level of AB (*X*) was expressed in relative fluorescence units (RFU) and estimated by the formula:

$$X = (\text{cell fluorescence} - \text{background fluorescence}) / \text{background fluorescence}.$$

The two-tailed t-test was used to analyse the differences in indices of viability and metabolic activity between various experimental groups.

Results and discussion

At the first stage of the research the MSC within alginate microbeads, as well as non-encapsulated cell suspension were cryopreserved using the one-step rapid freezing (regimen 1) in the presence of 10% DMSO. Viability of encapsulated MSC before freezing comprized $90 \pm 3\%$ (Fig. 1, a). Viability of cells in microspheres (Fig. 1, b) and in suspension after thawing, evaluated by FDA/EB staining was 6 ± 2 and $3 \pm 2\%$, correspondingly. After further 12 hrs culturing

плоские проекции всех полученных слоев вдоль оси z .

Для оценки активности пролиферативно-метаболических процессов в МСК применяли тест Alamar blue (AB) [25]. Клетки в виде суспензии и в составе альгинатных микросфер культивировали в течение 12 ч в среде, содержащей 10% раствора редокс-индикатора АВ (“Serotec”, Великобритания) в 24-луночной планшете (“Nunc”, США). После чего измеряли интенсивность флуоресценции восстановленной формы редокс-индикатора в среде культивирования на планшетном спектрофлуориметре “Tecan” (Австрия). Фоном служила среда с индикатором без клеток. Степень восстановленности АВ (X) выражали в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ) и определяли по формуле:

$$X = (\text{значение флуоресценции клеток} - \text{значение флуоресценции фона}) / \text{значение флуоресценции фона}.$$

Для анализа различий показателей сохранности и метаболической активности между различными экспериментальными группами использовали двухвыборочный t -тест.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы МСК в составе альгинатных микросфер, а также в виде суспензии одиночных клеток криоконсервировали с использованием быстрого одноэтапного замораживания (режим 1) в присутствии 10%-го ДМСО. Жизнеспособность инкапсулированных МСК перед замораживанием составляла $90 \pm 3\%$ (рис. 1, а). Жизнеспособность клеток в микросферах (рис. 1, б) и суспензии после отогрева, оцененная по окрашиванию ФДА/ЭБ, составила 6 ± 2 и $3 \pm 2\%$ соответственно. После последующего 12-часового культивирования инкапсулированных клеток с АВ значения флуоресценции редокс-индикатора достоверно не отличались от фона, что подтверждало гибель клеток. При микроскопии отогретых микросфер выявили, что гель микросфер приобрел мелкоячеистую структуру и в результате утратил прозрачность. Очевидно, структура альгинатного гидрогеля нарушается вследствие образования и роста в нем кристаллов льда.

Описанные результаты свидетельствуют о том, что использование быстрого замораживания даже в присутствии 10%-го ДМСО вызывает гибель практически всех МСК как в составе АМС, так и в виде суспензии одиночных клеток. Показано [15], что альгинатный гидрогель обладает криозащитными свойствами при быстром замораживании инкапсулированных гепатоцитов. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что при быстром замораживании криозащитный эффект не

of encapsulated cells with AB the values of redox-indicator fluorescence did not significantly differ from the background, that confirmed the cell death. The microscopy of thawed microbeads showed that the gel gained a fine sponged structure and as result lost the transparency. Obviously, the structure of alginate hydrogel was affected due to the formation and growth of ice crystals inside.

The described results testify to that fact that application of rapid freezing even in the presence of 10% DMSO leads to the death of almost all MSC, both within AMB, or in the non-encapsulated cell suspension. It has been shown recently [15] that alginate hydrogel has cryoprotective properties during rapid freezing of encapsulated hepatocytes. The results of present work indicate that no cryoprotective effect was manifested during rapid freezing, and changed AMB structure can additionally affect the cells. Further increase of DMSO concentration and exposure time, would obviously not prevent MSC death, since it was shown [13] that rapid freezing in presence of 32% DMSO and increased duration of exposure with cryoprotectant up to 30 min led to similar reduction of viability of encapsulated cells of African green monkey kidneys.

In several studies dealing with cryopreservation of different cell types within alginate microbeads using slow cooling rates [3, 14, 23] DMSO was applied in concentration of 5 to 20%. Considering that DMSO has a toxic effect on the cells in concentrations above 12% [21, 27] it is necessary to use the lower concentration.

In this respect at the next stage of the study the MSC in non-encapsulated suspension and within the microbeads were frozen by slow cooling (regimen 2) with $1^\circ\text{C}/\text{min}$ rate in the presence of 5 and 10% DMSO.

Viability of encapsulated MSC before freezing was $90 \pm 3\%$ (Fig. 1, a). Freeze-thawing of cells within microbeads in presence of 5 and 10% DMSO according to the 2nd regimen decreased the viability down to 61 ± 4 and $79 \pm 3\%$, correspondingly (Fig. 1, c, d; Fig. 2). Freeze-thawing of non-encapsulated cells was performed in the same conditions. Viability of non-encapsulated cells before freeze-thawing was 93 ± 3 , and thereafter decreased to 73 ± 5 and $84 \pm 2\%$ in the presence of 5 and 10% DMSO, correspondingly (Fig. 2).

The viability of non-encapsulated cell suspension after freeze-thawing in presence of 5% DMSO was significantly higher than of MSC within alginate microbeads. When increasing DMSO concentration up to 10% the viability of cells after freeze-thawing as suspension and within AMB did not differ and was significantly higher than that in the presence of 5% DMSO.

проявляется, а нарушение структуры АМС может оказывать дополнительное повреждающее действие на клетки. Последующее увеличение концентрации ДМСО и времени экспозиции с ним клеток, очевидно, не предотвратит гибель МСК, поскольку ранее наблюдали [13] сходное с полученным в нашей работе снижение жизнеспособности инкапсулированных клеток почек африканской зеленой мартышки при быстром замораживании под защитой 32%-го ДМСО и увеличении времени экспозиции с криопротектором до 30 мин.

В немногочисленных исследованиях, посвященных криоконсервированию различных типов клеток в составе альгинатных микросфер при медленных скоростях охлаждения [3, 14, 23], применяли ДМСО в концентрации от 5 до 20%. Учитывая, что ДМСО обладает токсическим действием на клетки, которое проявляется при концентрации выше 12% [21, 27], целесообразно использовать концентрацию ниже этих значений.

В связи с этим на следующем этапе работы МСК в суспензии и микросферах криоконсервировали с применением медленного замораживания (режим 2) со скоростью 1°C/мин в присутствии 5 и 10%-го ДМСО.

Жизнеспособность инкапсулированных МСК до замораживания составляла $90 \pm 3\%$ (рис. 1, а), а после замораживания-отогрева в присутствии 5 и 10% ДМСО по режиму 2 – 61 ± 4 и $79 \pm 3\%$ соответственно (рис. 1, в, г; рис. 2). Одновременно в тех же условиях замораживали суспензию МСК, неинкапсулированных в АМС. Жизнеспособность неинкапсулированных клеток до замораживания составляла 93 ± 3 , а после замораживания-отогрева

Encapsulated MSC reduced AB to the value of 2.27 ± 0.17 RFU prior to freeze-thawing. After freeze-thawing in the presence of 5 and 10% DMSO this value decreased down to 0.83 ± 0.10 and 1.44 ± 0.18 of RFU, accordingly (Fig. 3).

In the same conditions the non-encapsulated MSC suspension reduced AB to the value of 2.45 ± 0.04 RFU prior to freezing, and to 1.37 ± 0.07 and 1.54 ± 0.03 after freezing in the presence of 5 and 10% DMSO, correspondingly.

Thus, the ability of encapsulated cells to reduce AB after freeze-thawing in the presence of 5% DMSO was significantly lower than that of non-encapsulated MSC. However in the presence of 10% DMSO the AB reduction levels for AMB encapsulated and non-encapsulated cells after freeze-thawing not differ from each other and were significantly higher than in the case of application of 5% DMSO. Generally the changes in AB reduction level and viability of MSC both within AMB and in non-encapsulated suspension after freeze-thawing in the presence of 5 and 10% DMSO were similar, though the changes, found with AB test were more significant that testify to a higher sensitivity of the metabolic test.

The results obtained at this stage testify that slow freezing in the presence of 5% DMSO affect MSC within AMB more significantly than the cells in non-encapsulated suspension. These differences in cryosensitivity disappear when using DMSO in 10% concentration, and the viability of frozen-thawed MSC in both groups significantly increased. Therefore in further experiments the 10% DMSO concentration was used.

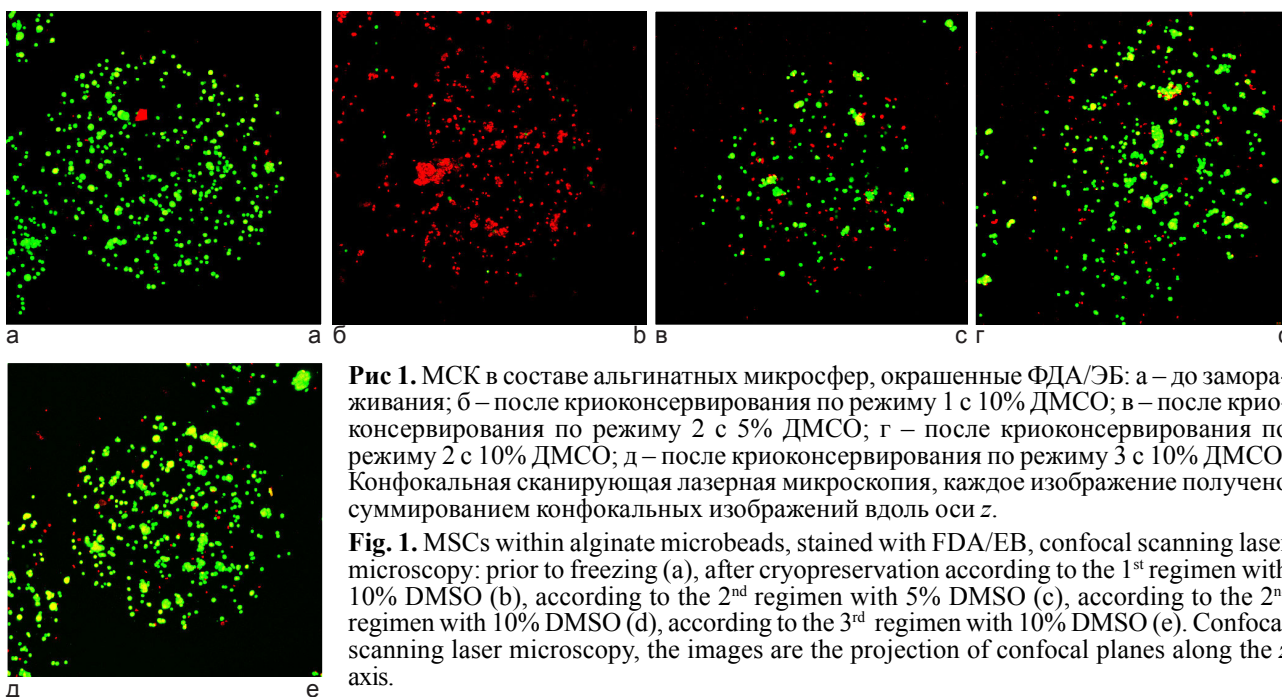


Рис 1. МСК в составе альгинатных микросфер, окрашенные FDA/ЭБ: а – до замораживания; б – после криоконсервирования по режиму 1 с 10% ДМСО; в – после криоконсервирования по режиму 2 с 5% ДМСО; г – после криоконсервирования по режиму 2 с 10% ДМСО; д – после криоконсервирования по режиму 3 с 10% ДМСО. Конфокальная сканирующая лазерная микроскопия, каждое изображение получено суммированием конфокальных изображений вдоль оси z.

Fig. 1. MSCs within alginate microbeads, stained with FDA/EB, confocal scanning laser microscopy: prior to freezing (a), after cryopreservation according to the 1st regimen with 10% DMSO (b), according to the 2nd regimen with 5% DMSO (c), according to the 2nd regimen with 10% DMSO (d), according to the 3rd regimen with 10% DMSO (e). Confocal scanning laser microscopy, the images are the projection of confocal planes along the z axis.

в присутствии 5 и 10%-го ДМСО – 73 ± 5 и $84 \pm 2\%$ соответственно (рис. 2).

Значение жизнеспособности суспензии инкапсулированных клеток после замораживания-отогрева под защитой 5%-го ДМСО была достоверно выше, чем МСК в составе альгинатных микросфер. При увеличении концентрации ДМСО до 10% жизнеспособность клеток после замораживания-отогрева в виде суспензии и в составе АМС не отличалась и была значительно выше, чем в присутствии 5%-го ДМСО.

До замораживания инкапсулированные МСК восстанавливали АВ до значения $2,27 \pm 0,17$ ОЕФ. После замораживания-отогрева в присутствии 5 и 10%-го ДМСО этот показатель снижался до $0,83 \pm 0,10$ и $1,44 \pm 0,18$ ОЕФ соответственно (рис. 3).

Одновременно с этим МСК в форме суспензии одиночных клеток до замораживания восстанавливали АВ до значения $2,45 \pm 0,04$, а после замораживания-отогрева в присутствии 5 и 10%-го ДМСО соответственно до $1,37 \pm 0,07$ и $1,54 \pm 0,03$ ОЕФ.

Таким образом, после замораживания-отогрева под защитой 5%-го ДМСО способность инкапсулированных клеток восстанавливать АВ была достоверно ниже, чем у МСК в виде суспензии. Вместе с тем, после замораживания-отогрева в присутствии 10%-го ДМСО уровни восстановленности редокс-индикатора для клеток в составе АМС и в виде суспензии не отличались и были достоверно выше, чем в группе с 5%-м ДМСО. В целом изменения степени восстановленности АВ и жизнеспособности МСК в АМС и суспензии после замораживания-отогрева в присутствии 5 и 10%-го ДМСО имели сходный характер, хотя различия, выявленные с помощью АВ-теста, были значительнее, что свидетельствует о более высокой чувствительности метаболического теста.

Полученные на данном этапе результаты свидетельствуют, что МСК в составе АМС при медленном замораживании под защитой 5%-го ДМСО повреждаются в большей мере, чем клетки в виде суспензии. Эти различия криочувствительности исчезают при концентрации ДМСО 10%, в результате чего значительно повышается сохранность криоконсервированных МСК в обеих группах. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали концентрацию ДМСО 10%.

Для минимизации криоповреждений суспензий клеток успешно применяется программное замораживание с инициацией кристаллизации. Возможность устранения критического переохлаждения цитоплазмы МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы, путем инициации кристаллизации при медленном замораживании практически не изучена. Поэтому в ходе дальнейших экспериментов инкапсулированные клетки замораживали под

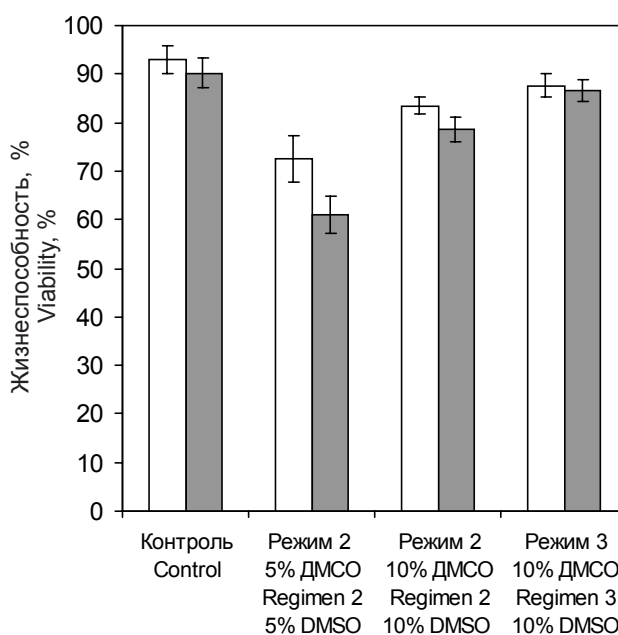


Рис. 2. Жизнеспособность МСК (%) в составе АМС (■) и в виде неинкапсулированной суспензии (□) после замораживания-отогрева по различным режимам.

Fig. 2. Viability of MSCs (%) within AMBs (■) and in non-encapsulated suspension (□) after freeze-thawing according to various regimens.

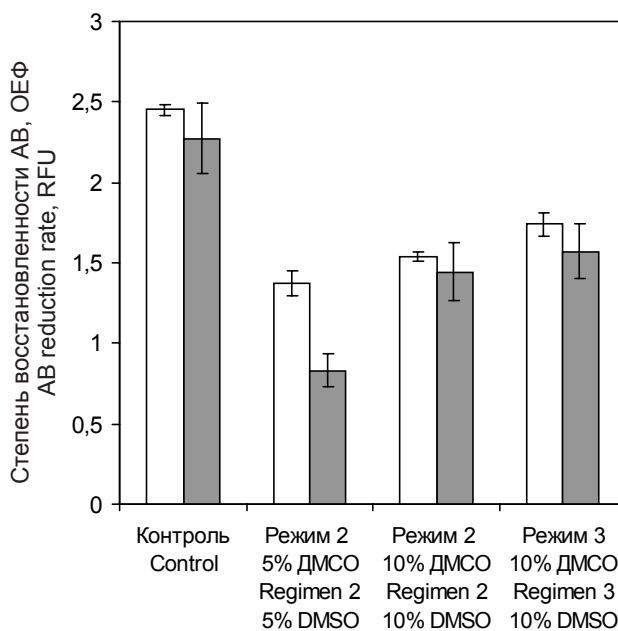


Рис. 3. Способность МСК в составе АМС (■) и в виде неинкапсулированной суспензии (□) восстанавливать редокс-индикатор АВ после замораживания-отогрева по различным режимам. Данные приведены в ОЕФ в пересчете на 20000 клеток.

Fig. 3. Ability of MSCs encapsulated in AMBs (■) and in non-encapsulated suspension (□) to reduce the AB redox-indicator after freeze-thawing according to the various regimens. The data are shown in RFU per 20,000 of cells.

защитой 10%-го ДМСО по медленному двухэтапному протоколу (режим 2) или по трехэтапному режиму с инициацией кристаллизации (режим 3).

Сохранность инкапсулированных МСК после замораживания-отогрева по режиму 3 достоверно не отличалась от значений контроля (до замораживания) и составила $87 \pm 2\%$ (см. рис. 1, д). При этом она была достоверно выше, чем после использования режима 2 ($79 \pm 3\%$) (рис. 2). Аналогичные показатели сохранности были получены и после криоконсервирования МСК в виде суспензии: по режиму 3 – $88 \pm 2\%$ и режиму 2 – $84 \pm 2\%$.

Инкапсулированные МСК после замораживания-отогрева по режиму 3 восстанавливали АВ до значения $1,57 \pm 0,17$ ОЕФ, которое было достоверно ниже, чем до замораживания ($2,27 \pm 0,22$), и не отличалось от результатов после замораживания по режиму 2 ($1,44 \pm 0,18$) (рис. 3). Схожая динамика наблюдалась в неинкапсулированных клетках. После замораживания-отогрева МСК в виде суспензии по режиму 3 степень восстановленности АВ ($1,74 \pm 0,07$) была достоверно ниже, чем до замораживания ($2,45 \pm 0,04$), и не отличалась от результатов после замораживания по режиму 2 ($1,54 \pm 0,03$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что инициация кристаллизации устраняет критическое переохлаждение МСК в альгинатных микросферах при медленном замораживании. Ранее сообщалось, что инициацию кристаллизации с успехом применяли при криоконсервировании хондроцитов [3] и трансформированных эмбриональных клеток почки [26], инкапсулированных в АМС, что позволило обеспечить высокую сохранность деконсервированных клеток в пределах 80–86%.

При анализе результатов не выявлено достоверных отличий в показателях сохранности и метаболической активности между МСК, криоконсервированными под защитой 10%-го ДМСО, в составе АМС и в виде суспензии. Это доказывает, что инкапсуляция в альгинатный гидрогель не влияет на криочувствительность МСК при замораживании при данной концентрации криопротектора. Вместе с тем МСК в составе АМС после криоконсервирования под защитой 5%-го ДМСО имели более низкие показатели сохранности и метаболической активности, чем неинкапсулированные клетки. Возможно, этот факт связан с тем, что альгинатный гидрогель замедляет распределение криопротектора внутри микросфер, что проявляется при его концентрации ниже оптимального уровня. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты работы [3], в которой высокие показатели жизнеспособности клеток после замораживания-отогрева в присутствии 5%-го ДМСО

For minimization of cryodamages of cell suspensions the controlled rate freezing with initiation of crystallization is successfully used. The possibility to eliminate the critical overcooling of cytoplasm in the MSC, encapsulated in alginate microbeads by initiation of crystallization during slow freezing have not been excessively studied. Thus, the further experiments were performed in encapsulated cells under protection of 10% DMSO using the two step slow freezing (regimen 2) or three-step freezing with initiation of crystallization (regimen 3).

Viability of encapsulated MSC after freeze-thawing according to the regimen 3 did not significantly differ from the control values (before the cryopreservation) and comprised $87 \pm 2\%$ (see Fig. 1, e). It was significantly higher, than after freezing according to the regimen 2 ($79 \pm 3\%$, Fig. 2). The similar viability values were obtained after freeze-thawing of non-encapsulated MSC suspension according to the regimen 3 ($88 \pm 2\%$) and regimen 2 ($84 \pm 2\%$).

Encapsulated MSC after freeze-thawing according to the regimen 3 reduced AB to the value of 1.57 ± 0.17 RFU, that was significantly lower comparing to pre-freezing level (2.27 ± 0.22) and did not differ from the values after freeze-thawing according to the regimen 2 (1.44 ± 0.18 , Fig. 3). The same dynamics was observed in non-encapsulated group. After freeze-thawing of non-encapsulated MSC suspension according to the regimen 3 the level of AB reduction (1.74 ± 0.07) was significantly lower than pre-freezing one (2.45 ± 0.04) and did not differ from the value obtained after freeze-thawing according to the regimen 2 (1.54 ± 0.03).

The obtained data testify to the fact that initiation of crystallization eliminates the critical overcooling in encapsulated MSC during slow freezing. It has been reported recently that initiation of crystallization was successfully applied during cryopreservation of chondrocytes [3] and transformed fetal kidney cell [26], encapsulated in AMB, that enabled to provide a high viability of frozen-thawed cells within the range of 80–86%.

When analyzing the results no significant differences were found in viability indices and metabolic activity between both encapsulated and non-encapsulated MSC, frozen-thawed in the presence of 10% DMSO. So it is no evidence that encapsulation in alginate hydrogel affect MSC cryosensitivity during freeze-thawing in the presence of cryoprotectant in this concentration. Herewith the encapsulated MSC had lower viability and metabolic activity indices after cryopreservation in the presence of 5% DMSO than non-encapsulated cells. Probably this fact is associated with slower diffusion of cryoprotectant inside the alginate hydrogel microbeads and the resulted concentration appeared to be lower than optimal level.

достигались при длительной эквilibрации с криопротектором. Результаты настоящего исследования не подтверждают криозащитное действие альгината, показанное в работе [15].

Следует отметить, что гидрогель в АМС не утрачивал прозрачность, оцененную визуально после медленного замораживания (режимы 2 и 3), в отличие от быстрого замораживания (режим 1). Это свидетельствует о сохранении структурной целостности альгинатного геля при медленном замораживании в описанных условиях, что является важным критерием для разработки адекватного протокола криоконсервирования клеток в составе альгинатных микросфер.

Выводы

1. Криоконсервирование МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы, с использованием быстрого охлаждения сопровождается изменением оптических свойств гидрогеля и приводит к гибели клеток.

2. Использование медленного замораживания при криоконсервировании МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы, под защитой 5 и 10%-го ДМСО позволяет в значительной степени сохранить жизнеспособность клеток. При этом показатели сохранности и метаболической активности клеток зависят от концентрации ДМСО в криозащитной среде. При повышении концентрации ДМСО с 5 до 10% сохранность инкапсулированных клеток после криоконсервирования возрастает почти на 20%, а показатели АВ-теста – на 70%.

3. Сравнительное изучение МСК в составе альгинатных микросфер и в виде суспензии одиночных неинкапсулированных клеток при криоконсервировании под защитой 10% ДМСО не выявило существенных различий в их криочувствительности, а в присутствии 5% ДМСО МСК в составе альгинатных микросфер имели более низкие показатели жизнеспособности.

4. Контроль критического переохлаждения внутриклеточного содержимого путем инициации кристаллизации в ходе медленного программного замораживания при криоконсервировании МСК в составе альгинатных микросфер в присутствии 10% ДМСО позволяет добиться максимальных значений сохранности и метаболической активности инкапсулированных клеток.

Литература

1. Петренко А.Ю., Мазур С.П., Петренко Ю.А. и др. Выделение и дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // Трансплантология.– 2007.– Т. 9, №1.– С. 218–220.

This suggestion is confirmed by the data of Almqvist *et al.* [3] showed the higher cell viability after freeze-thawing in the presence of 5% DMSO achieved after prolonged equilibration with cryoprotectant. The results of this research do not confirm cryoprotective effect of alginate, shown by Kusano *et al.* [15].

It should be noted that the AMB hydrogel did not lose the transparency visually assessed after slow freezing (regimens 2 and 3) in contrast to the rapid freezing (regimen 1). This testifies to preservation of structural integrity of alginate hydrogel during slow freezing in described conditions, and this is an important criterion for development of adequate cryopreservation protocol for cells encapsulated in alginate microbeads.

Conclusions

1. Cryopreservation of MSC, encapsulated in alginate microbeads, using rapid cooling is accompanied by changes in hydrogel optical properties and results in cell death.

2. Application of slow freezing in the presence of 5 and 10% DMSO during cryopreservation of MSC, encapsulated in alginate microbeads, enables to preserve significantly the cell viability. Herewith the indices of viability and cell metabolic activity depend on DMSO concentration in cryoprotective medium. When increasing DMSO concentration from 5 up to 10% the viability of encapsulated cells after freeze-thawing rises by approximately 20%, and AB test indices do by 70%.

3. Comparative study of MSC encapsulated in alginate microbeads and in non-encapsulated suspension during freeze-thawing in the presence of 10% DMSO did not reveal significant differences in their cryosensitivity, and in the presence of 5% DMSO the post-thaw viability of MSC encapsulated in alginate microbeads was lower.

4. The elimination of critical overcooling of intracellular content by initiation of crystallization during slow controlled rate freezing during cryopreservation of MSC within alginate microbeads in the presence of 10% DMSO enables to obtain the maximal values of viability and metabolic activity of encapsulated cells.

References

1. Petrenko A.Yu., Mazur S.P., Petrenko Yu.A. *et al.* Isolation and differentiation of stromal cells from fetal and adult human tissues // *Transplantologiya*.– 2007.– Vol. 9, N1.– P. 218–220.
2. Abdallah B.M., Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications // *Gene Ther.*– 2008.– Vol. 15, N2.– P. 109–116.
3. Almqvist K.F., Wang L., Broddelez C. *et al.* Biological freezing of human articular chondrocytes // *Osteoarthritis Cartilage*.– 2001.– Vol. 9, N4.– P. 341–350.

2. *Abdallah B.M., Kassem M.* Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications // *Gene Ther.*— 2008.— Vol. 15, N2.— P. 109–116.
3. *Almqvist K.F., Wang L., Broddelez C. et al.* Biological freezing of human articular chondrocytes // *Osteoarthritis Cartilage.*— 2001.— Vol. 9, N4.— P. 341–350.
4. *Alsberg E., Anderson K.W., Albeiruti A. et al.* Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering // *J. Dent. Res.*— 2001.— Vol. 80, N11.— P. 2025–2029.
5. *Aoki T., Koizumi T., Kobayashi Y. et al.* A novel method of cryopreservation of rat and human hepatocytes by using encapsulation technique and possible use for cell transplantation // *Cell Transplant.*— 2005.— Vol. 14, N9.— P. 609–620.
6. *Dankberg F., Persidsky M.D.* A test of granulocyte integrity and phagocytic function // *Cryobiology.*— 1976.— Vol. 13, N4.— P. 430–432.
7. *Dezawa M., Kanno H., Hoshino M. et al.* Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation // *J. Clin. Invest.*— 2004.— Vol. 113, N12.— P. 1701–1710.
8. *Duggal S., Frønsdal K.B., Szöke K. et al.* Phenotype and gene expression of human mesenchymal stem cells in alginate scaffolds // *Tissue Eng. A.*— 2009.— Vol. 15, N7.— P. 1763–1773
9. *Frith J.E., Thomson B., Genever P.* Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential // *Tissue Eng. C.*— 2010.— Vol. 16, N4.— P. 735–749.
10. *Gao L., McBeath R., Chen C.S.* Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin // *Stem Cells.*— 2010.— Vol. 28, N3.— P. 564–572.
11. *Ghidoni I., Chlapanidas T., Bucco M. et al.* Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine // *Cytotechnology.*— 2008.— Vol. 58, N1.— P. 49–56.
12. *Goh B.C., Thirumala S., Kilroy G. et al.* Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability // *J. Tissue Eng. Regen. Med.*— 2007.— Vol. 1, N4.— P. 322–324.
13. *Heng B.C., Yu H., Ng S.C.* Strategies for the cryopreservation of microencapsulated cells // *Biotechnol. Bioeng.*— 2004.— Vol. 85, N2.— P. 202–213.
14. *Jiang Q., Zhang S.Z., Peng J.P., Wang X.L.* Preparation and in vitro studies of microencapsulated cells releasing human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*— 2005.— Vol. 6, N9.— P. 859–864.
15. *Kusano T., Aoki T., Yasuda D. et al.* Microencapsule technique protects hepatocytes from cryoinjury // *Hepatol. Res.*— 2008.— Vol. 38, N6.— P. 593–600.
16. *Lee D.A., Reisler T., Bader D.L.* Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques // *Acta Orthop. Scand.*— 2003.— Vol. 74, N1.— P. 6–15.
17. *Lim F., Sun A.M.* Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas // *Science.*— 1980.— Vol. 210, N4472.— P. 908–910.
18. *Liu G., Shu C., Cui L. et al.* Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells // *Cryobiology.*— 2008.— Vol. 56, N3.— P. 209–215
19. *Luk J.M., Wang P.P., Lee C.K. et al.* Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of *in vitro* co-culture and intra-portal transplantation models // *J. Immunol. Methods.*— 2005.— Vol. 305, N1.— P. 39–47.
20. *Majore I., Moretti P., Hass R., Kasper C.* Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord // *Cell Commun. Signal.*— 2009.— Vol. 7.— 6.
21. *Malinin T.I., Perry Vol.P.* Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells // *Cryobiology.*— 1967.— Vol. 4, N2.— P. 90–96.
22. *McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M. et al.* Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Dev. Cell.*— 2004.— Vol. 6, N4.— P. 483–495.
23. *Murua A., Orive G., Hernandez R.M., Pedraz J.L.* Cryopreservation based on freezing protocols for the long-term
4. *Alsberg E., Anderson K.W., Albeiruti A. et al.* Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering // *J. Dent. Res.*— 2001.— Vol. 80, N11.— P. 2025–2029.
5. *Aoki T., Koizumi T., Kobayashi Y. et al.* A novel method of cryopreservation of rat and human hepatocytes by using encapsulation technique and possible use for cell transplantation // *Cell Transplant.*— 2005.— Vol. 14, N9.— P. 609–620.
6. *Dankberg F., Persidsky M.D.* A test of granulocyte integrity and phagocytic function // *Cryobiology.*— 1976.— Vol. 13, N4.— P. 430–432.
7. *Dezawa M., Kanno H., Hoshino M. et al.* Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation // *J. Clin. Invest.*— 2004.— Vol. 113, N12.— P. 1701–1710.
8. *Duggal S., Frønsdal K.B., Szöke K. et al.* Phenotype and gene expression of human mesenchymal stem cells in alginate scaffolds // *Tissue Eng. A.*— 2009.— Vol. 15, N7.— P. 1763–1773
9. *Frith J.E., Thomson B., Genever P.* Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential // *Tissue Eng. C.*— 2010.— Vol. 16, N4.— P. 735–749.
10. *Gao L., McBeath R., Chen C.S.* Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin // *Stem Cells.*— 2010.— Vol. 28, N3.— P. 564–572.
11. *Ghidoni I., Chlapanidas T., Bucco M. et al.* Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine // *Cytotechnology.*— 2008.— Vol. 58, N1.— P. 49–56.
12. *Goh B.C., Thirumala S., Kilroy G. et al.* Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability // *J. Tissue Eng. Regen. Med.*— 2007.— Vol. 1, N4.— P. 322–324.
13. *Heng B.C., Yu H., Ng S.C.* Strategies for the cryopreservation of microencapsulated cells // *Biotechnol. Bioeng.*— 2004.— Vol. 85, N2.— P. 202–213.
14. *Jiang Q., Zhang S.Z., Peng J.P., Wang X.L.* Preparation and in vitro studies of microencapsulated cells releasing human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*— 2005.— Vol. 6, N9.— P. 859–864.
15. *Kusano T., Aoki T., Yasuda D. et al.* Microencapsule technique protects hepatocytes from cryoinjury // *Hepatol. Res.*— 2008.— Vol. 38, N6.— P. 593–600.
16. *Lee D.A., Reisler T., Bader D.L.* Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques // *Acta Orthop. Scand.*— 2003.— Vol. 74, N1.— P. 6–15.
17. *Lim F., Sun A.M.* Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas // *Science.*— 1980.— Vol. 210, N4472.— P. 908–910.
18. *Liu G., Shu C., Cui L. et al.* Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells // *Cryobiology.*— 2008.— Vol. 56, N3.— P. 209–215
19. *Luk J.M., Wang P.P., Lee C.K. et al.* Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of *in vitro* co-culture and intra-portal transplantation models // *J. Immunol. Methods.*— 2005.— Vol. 305, N1.— P. 39–47.
20. *Majore I., Moretti P., Hass R., Kasper C.* Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord // *Cell Commun. Signal.*— 2009.— Vol. 7.— 6.
21. *Malinin T.I., Perry Vol.P.* Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells // *Cryobiology.*— 1967.— Vol. 4, N2.— P. 90–96.
22. *McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M. et al.* Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Dev. Cell.*— 2004.— Vol. 6, N4.— P. 483–495.
23. *Murua A., Orive G., Hernandez R.M., Pedraz J.L.* Cryopreservation based on freezing protocols for the long-term
24. *Nolan J.S., Packer L.* Monolayer culture techniques for normal human diploid fibroblasts // *Methods Enzymol.*— 1974.— Vol. 32, Part B.— P. 561–568.

- storage of microencapsulated myoblasts // *Biomaterials.*– 2009.– Vol. 30, N20.– P. 3495–3501.
24. Nolan J.S., Packer L. Monolayer culture techniques for normal human diploid fibroblasts // *Methods Enzymol.*– 1974.– Vol. 32, Part B.– P. 561–568.
 25. Petrenko Y.A., Gorokhova N.A., Tkachova E.N., Petrenko A.Y. The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria // *Укр. біохім. журнал.*– 2005.– Т. 77, №5.– С. 100–105.
 26. Stensvaag V., Furmanek T., Lonning K. et al. Cryopreservation of alginate-encapsulated recombinant cells for antiangiogenic therapy // *Cell Transplant.*– 2004.– Vol. 13, N1.– P. 35–44.
 27. Tomford W.W., Fredericks G.R., Mankin H.J. Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes // *J. Bone Joint Surg. Am.*– 1984.– Vol. 66, N2.– P. 253–259.
 28. Tomkoria S., Masuda K., Mao J. Nanomechanical properties of alginate-recovered chondrocyte matrices for cartilage regeneration // *Proc. Inst. Mech. Eng. H.*– 2007.– Vol. 221, N5.– P. 467–473.
 29. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering // *Arthritis Res. Ther.*– 2003.– Vol. 5, N1.– P. 32–45.
 30. Wu Y.N., Yang Z., Hui J.H. et al. Cartilaginous ECM component-modification of the micro-bead culture system for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *Biomaterials.*– 2007.– Vol. 28, N28.– P. 4056–4067.
 31. Xiang Y., Zheng Q., Jia B.B. et al. Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*– 2007.– Vol. 8, N2.– P. 136–146.
 25. Petrenko Y.A., Gorokhova N.A., Tkachova E.N., Petrenko A.Y. The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria // *Ukr. Biokhim. Zhurnal.*– 2005.– Vol. 77, N5.– P. 100–105.
 26. Stensvaag V., Furmanek T., Lonning K. et al. Cryopreservation of alginate-encapsulated recombinant cells for antiangiogenic therapy // *Cell Transplant.*– 2004.– Vol. 13, N1.– P. 35–44.
 27. Tomford W.W., Fredericks G.R., Mankin H.J. Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes // *J. Bone Joint Surg. Am.*– 1984.– Vol. 66, N2.– P. 253–259.
 28. Tomkoria S., Masuda K., Mao J. Nanomechanical properties of alginate-recovered chondrocyte matrices for cartilage regeneration // *Proc. Inst. Mech. Eng. H.*– 2007.– Vol. 221, N5.– P. 467–473.
 29. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering // *Arthritis Res. Ther.*– 2003.– Vol. 5, N1.– P. 32–45.
 30. Wu Y.N., Yang Z., Hui J.H. et al. Cartilaginous ECM component-modification of the micro-bead culture system for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *Biomaterials.*– 2007.– Vol. 28, N28.– P. 4056–4067.
 31. Xiang Y., Zheng Q., Jia B.B. et al. Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*– 2007.– Vol. 8, N2.– P. 136–146.

Accepted in 16.03.2010

*Поступила 16.03.2010
Рецензент Т.Ф. Петренко*