

УДК 611.018.46.085.23

В.С. Зайков, Д.Н. Тарусин, А.Ю. Петренко*

Влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы на жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток после экспозиции с проникающими криопротекторами

UDC 611.018.46.085.23

V.S. Zaikov, D.N. Tarusin, A.Yu. Petrenko*

Effect of Encapsulation into Alginate Microspheres on Viability of Mesenchymal Stromal Cells after Exposure with Penetrating Cryoprotectants

Реферат: В работе изучено влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы (АМС) на жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток (МСК) после экспозиции в течение 1,5 и 5 мин с растворами проникающих криопротекторов диметилсульфоксида (ДМСО), этиленгликоля (ЭГ) и 1,2-пропандиола (1,2-ПД) в концентрациях от 1,5 до 9 М. Установлено, что показатель жизнеспособности МСК в виде суспензии и АМС снижается с увеличением концентрации криопротекторов и времени экспозиции, а инкапсуляция в АМС существенно уменьшает токсическое повреждение клеток криопротекторами. Так, если 5-минутная экспозиция МСК в виде суспензии с 9 М ДМСО, ЭГ и 1,2-ПД приводила к гибели практически всех клеток в суспензии, то жизнеспособность МСК в составе АМС после экспозиции в аналогичных условиях составляла 60, 80 и 52% соответственно. Установлено, что исследованные проникающие криопротекторы обладают разной цитотоксичностью по отношению к МСК, которая снижается в ряду ДМСО > 1,2-ПД > ЭГ. Полученные результаты могут быть использованы при разработке многокомпонентных витрифицирующих растворов.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, альгинатные микросферы, витрификация, мультикомпонентный раствор криопротекторов, диметилсульфоксид, этиленгликоль, 1,2-пропандиол.

Реферат: У роботі вивчено вплив інкапсуляції в альгінатні мікросфери (АМС) на життєздатність мезенхімальних стромальних клітин (МСК) після експозиції протягом 1,5 і 5 хв із розчинами проникних криопротекторів диметилсульфоксиду (ДМСО), етиленгліколю (ЕГ) і 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) у концентраціях від 1,5 до 9 М. Встановлено, що показник життєздатності МСК у суспензії та АМС знижується зі збільшенням концентрації криопротекторів та часу експозиції, а інкапсуляція в АМС суттєво зменшує токсичне пошкодження криопротекторами клітин. Так, якщо 5-хвилинна експозиція з 9 М ДМСО, ЕГ і 1,2-ПД призводила до загибелі практично всіх клітин у суспензії, то життєздатність МСК у складі АМС після експозиції в аналогічних умовах становила 60, 80 і 52% відповідно. Доведено, що досліджені проникні криопротектори мають різну цитотоксичність по відношенню до МСК, яка знижується у ряду ДМСО > 1,2-ПД > ЕГ. Отримані результати можуть бути використані під час розробки багатокомпонентних розчинів для вітрифікації.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, альгінатні мікросфери, вітрифікація, мультикомпонентний розчин криопротекторів, диметилсульфоксид, етиленгліколь, 1,2-пропандіол.

Abstract: The effect of encapsulation into alginate microspheres (AMS) on viability of mesenchymal stromal cells (MSCs) after exposure to the solutions of penetrating cryoprotectants dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and 1,2-propane diol (1,2-PD) with concentrations varying from 1.5 to 9 M during 1.5 and 5 min was studied. It was shown that the viability of MSCs both as a suspension and encapsulated in AMS decreased with a rise in cryoprotectant concentration and exposure time. Encapsulation into AMS significantly protected the cells from cytotoxic damage of the cryoprotectants, e. g. if the 5-min exposure to 9 M DMSO, EG and 1,2-PD resulted in the death of quite all the cells in the suspension, the viability of encapsulated MSCs after exposure under similar conditions made 60, 80 and 52% respectively. It was found that the studied penetrating cryoprotectants had a various cytotoxicity to MSCs, and it decreased in the row DMSO > 1,2-PD > EG. The findings can be used to develop a multi-component vitrifying solution.

Key words: mesenchymal stromal cells, alginate microspheres, vitrification, multicomponent solution of cryoprotectants, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, 1,2-propane diol.

Инкапсуляция клеток в альгинатные микросферы (АМС) позволяет обеспечить надежную иммобилизацию и иммуноизоляцию клеток при трансплантации, а также обмен низкомолекулярными веществами между клетками и средой [5,

Encapsulation of cells into alginate microspheres (AMS) enables the reliable immobilization and immune isolation of cells during transplantation, as well as the exchange of low molecular weight substances between cells and environment [15, 18, 25]. To establish a stock

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

Department of Cryobiochemistry, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: alexander_petrenko@cryo.org.ua

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: alexander_petrenko@cryo.org.ua

Поступила 23.11.2015

Принята в печать 29.03.2016

Received November, 23, 2015

Accepted March, 29, 2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 213–220.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(3): 213–220.

© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

19, 25]. Для создания запаса инкапсулированных мезенхимальных стромальных клеток необходимы разработка новых и усовершенствование существующих методов их криоконсервирования. В связи с этим актуально изучение влияния инкапсуляции на протоколы криоконсервирования.

Одним из основных подходов к криоконсервированию мезенхимальных стромальных клеток в составе АМС является витрификация, успешная реализации которой согласно большинству протоколов возможна при высоких концентрациях криопротекторов [13]. Для снижения общего токсического влияния криопротекторов применяют их смеси [15]. Так, было показано [1], что высоких показателей жизнеспособности мезенхимальных стромальных клеток в суспензии (сМСК) можно добиться при витрификации, которая обеспечивается использованием смеси криопротекторов «ДЭПС», включающей диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль (ЭГ), 1,2-пропандиол (1,2-ПД) и сахарозу.

При витрификации клеток, заключенных в АМС, необходимо учитывать, что структура альгинатного гидрогеля влияет на скорость протекания процессов массообмена [14, 22] и, соответственно, замедляет проникновение криопротекторов, а также насыщение ими клеток. В этом случае успешной витрификации можно добиться двумя способами.

Первый способ – увеличение времени экспозиции с растворами криопротекторов. Нами было установлено, что для достижения высокой жизнеспособности МСК при витрификации в составе АМС необходима их длительная экспозиция с витрифицирующим раствором «ДЭПС» по сравнению с клетками в составе суспензии. Время экспозиции возрастало с увеличением диаметра АМС от 0,5 до 1,2 мм [24]. При этом важно учитывать, что длительный контакт МСК с растворами криопротекторов может привести к токсическому повреждению инкапсулированных клеток.

Второй способ – повышение концентрации криопротекторов. В нашем случае при использовании смеси «ДЭПС» была увеличена концентрация криопротекторов с минимальным цитотоксическим действием. Следует отметить, что в современной литературе данные о влиянии экспозиции инкапсулированных МСК (иМСК) дермы человека с растворами криопротекторов, входящих в состав «ДЭПС», на показатель жизнеспособности практически отсутствуют.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния экспозиции с криопротекторами (этиленгликоль, 1,2-пропандиол и диметилсульфоксид) на жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток в суспензии и альгинатных microspheres.

of encapsulated mesenchymal stromal cells there is a need in developing new and improving the existing methods of cryopreservation. Therefore the study of the effect of encapsulation on cryopreservation protocols is quite important.

One of the basic approaches to cryopreserve mesenchymal stromal cells (MSCs) within the AMS is vitrification, which is conventionally realised using high concentrations of cryoprotectants [9]. Their mixtures are used to reduce the total toxic effects of cryoprotectants [11]. Thus, it has been shown [7], that a high viability of mesenchymal stromal cells in suspension (sMSCs) can be achieved with vitrification, which was performed using a cryoprotectant mixture DEPS, comprising dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), 1,2-propanediol (1,2-PD) and sucrose.

During vitrification of the cells enclosed into AMS, it should be considered that the alginate hydrogel structure affects the rate whereat the mass transfer processes proceed [10, 20] and, consequently, slows down the penetration of cryoprotectants, as well as the saturation of the cells with them. In this case, a successful vitrification can be achieved in two ways.

The first way is to prolong an exposure with solutions of cryoprotectants. We have found that a high viability of MSCs following vitrification inside AMS required their long exposure with the vitrification solution DEPS compared to the cells being in the suspension. The exposure time enhanced with increasing diameter of the AMS from 0.5 up to 1.2 mm [24]. Herewith it is important to have in mind that long term contact of MSCs with the solutions of cryoprotectants can cause a toxic damage to the encapsulated cells.

The second way is to raise the concentration of cryoprotectants. In case of DEPS mixture, we have increased the concentration of cryoprotectants possessing a minimal cytotoxic effect. It should be noted that nowadays there are no reports on the effect of exposure of encapsulated human dermal MSCs (eMSCs) in the solutions of cryoprotectants constituting DEPS mixture rendered on cell viability.

Therefore the aim of this research was to study the influence of exposure to cryoprotectants (ethylene glycol, 1,2-propanediol and dimethyl sulfoxide) on viability of mesenchymal stromal cells in suspension and alginate microspheres.

Materials and methods

Mesenchymal stromal cells were isolated from human dermis by explantation of the pieces [17]. Skin fragments were obtained after a written consent from adult donors. The cells were cultured in α -MEM (Sigma, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma), 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity.



Материалы и методы

Мезенхимальные стромальные клетки выделяли из дермы человека методом эксплантации кусочков [4]. Фрагменты кожи получали после письменного согласия от взрослых доноров. Клетки культивировали в среде α -MEM («Sigma», США), дополненной 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота («Sigma»), 2 мМ *L*-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Инкапсуляцию МСК проводили по методике, описанной ранее [5]. Клетки 2–3-го пассажей по достижении 60–70% конfluence в монослое снимали с культурального пластика, используя раствор версен-трипсина, по стандартной методике и центрифугировали при 200g в течение 7 мин. Полученный осадок ресуспендировали в очищенном 1,2%-м растворе альгината натрия («Sigma»), затем суспензию покапельно вносили в 100 мМ раствор CaCl₂ на 10 мин для полимеризации. Средний размер микросфер составлял 1,2 мм. Полученные иМСК отмывали физиологическим раствором (ФР), содержащим 0,9% NaCl и 25 мМ HEPES, и использовали для дальнейших экспериментов.

Экспозицию проводили при комнатной температуре в течение 1,5 или 5 мин [3]. Для экспозиции в пробирки, содержащие капсулы или клетки в 100 мкл ФР, вносили по 900 мкл одного из криопротекторов (ДМСО, 1,2-ПД или ЭГ) в разных концентрациях (1,5; 3; 5; 7,5 и 9 М). После экспозиции с криопротекторами образцы помещали в 0,5 М раствор сахарозы в ФР с последующим поэтапным десятикратным разведением средой культивирования.

Для определения количества жизнеспособных МСК в составе суспензии и микросфер использовали МТТ-тест (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) [8]. С этой целью клетки в течение 2 ч инкубировали в среде, содержащей 5 мг/мл МТТ. Клетки, накопившие формазан, подсчитывали с помощью светового микроскопа («СЕТИ», Бельгия). Показатель жизнеспособности определяли как отношение количества клеток, накопивших формазан, к общему количеству. Образцы, не подвергавшиеся экспозиции с криопротекторами, служили контролем, при этом их жизнеспособность принимали за 100%.

Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет R и представляли в виде $M \pm m$. Значимость отличий между полученными выборками оценивали параметрическим методом с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было установлено, что получить высокие показатели жизнеспособности сМСК и

MSCs were encapsulated as described previously [18]. After reaching 60–70% of confluence in a monolayer the cells of passages 2–3 were detached from culture plastic using Trypsin-Versene solution by the standard methods and centrifuged at 200g for 7 min. The resulted pellet was re-suspended in 1.2% purified sodium alginate solution (Sigma), then the suspension was dropwise added into 100 mM CaCl₂ solution within 10 min for polymerization. An average microsphere size was of 1.2 mm. The obtained eMSCs were washed with a physiological solution (PS), containing 0.9% NaCl and 25 mM HEPES, and were used for further experiments.

Exposure was carried out at room temperature either for 1.5 or 5 min [23]. The tubes containing either capsules or cells in 100 ml PS were filled with 900 ml of a cryoprotectant (DMSO, 1,2-PD or EG) at various concentrations (1.5, 3, 5, 9 and 7.5 M). After the exposure with cryoprotectants the samples were placed in a 0.5 M sucrose solution in PS, and then gradually diluted ten-times with the culture medium.

To determine the number of viable MSCs in the suspension or microspheres we used the MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) [3]. With this purpose, the cells were incubated for 2 hrs in a medium containing 5 mg/ml MTT. The cells accumulated formazan were counted using a light microscope (CETI, Belgium). The viability index was determined as the ratio of the number of cells that had accumulated formazan to the total number. Samples not incubated with cryoprotectants served as the controls and their viability was assumed as 100%.

For statistical analysis of the results obtained there was used R environment; the data were presented as $M \pm m$. The significance of the differences between the samples was evaluated by parametric method using Student's *t*-test.

Results and discussion

We have shown previously that high viability of sMSCs and prevention of ice crystals appearance during rapid freezing and thawing were possible after 1.5 min exposure with a mixture of cryoprotectants DEPS and subsequent vitrification [7]. Successful vitrification of eMSCs was achieved after the exposure time with the same solution was increased up to 5 min [22]. Therefore, in the present study the influence of cryoprotectants constituting DEPS on viability of eMSCs and sMSCs was studied after exposure to DMSO, EG and 1,2-PD cryoprotectants for 1.5 and 5 min to interpret closely the previous results.

As Table 1 shows the 1.5 minute-long exposure with 1.5 M solutions of all the tested cryoprotectants the viabilities of eMSCs and sMSCs were lower than



предотвратить возникновение кристаллов льда при быстром замораживании и отогреве удалось после 1,5-минутной экспозиции и последующей витрификации со смесью криопротекторов «ДЭПС» [1]. Для успешной витрификации иМСК время экспозиции с тем же раствором было увеличено до 5 мин [2]. Поэтому в настоящей работе влияние криопротекторов, входящих в состав «ДЭПС», на жизнеспособность иМСК и сМСК исследовали после экспозиции с криопротекторами ДМСО, ЭГ и 1,2-ПД в течение 1,5 и 5 мин для более детального сравнения с ранее полученными результатами.

Как видно из табл. 1, после экспозиции в течение 1,5 мин показатель жизнеспособности иМСК и сМСК с 1,5 М растворами всех исследованных криопротекторов был ниже контрольного, но сохранялся на высоком уровне (не менее 80%). При повышении концентрации криопротекторов до 3 М данный показатель незначительно отличался от полученного после экспозиции иМСК и сМСК с 1,5 М раствором (за исключением 1,2-ПД, после контакта с которым значительно увеличивалось количество погибших клеток). После 1,5-минутной экспозиции клеток с криопротекторами в концентрации 5 М показатель жизнеспособности незначительно отличался от данных, полученных при концентрации криопротекторов 3 М: значительное снижение жизнеспособности отмечено после экспозиции клеток в суспензии с ДМСО и 1,2-ПД.

Резкое снижение показателя жизнеспособности сМСК после экспозиции со всеми исследованными криопротекторами установлено при концентрации 7 и 9 М (табл. 1). При этом наибольшей цитотоксичностью обладал ДМСО в указанных концентрациях, о чем свидетельствует показатель жизнеспособности клеток, который составлял 21 и 4% соответственно. Жизнеспособность сМСК после экспозиции с 7 М растворами ЭГ и 1,2-ПД находилась на одном уровне (62–67%), а при концентрации 9 М 1,2-ПД оказывал более выраженный цитотоксический эффект. В то же время МСК в составе АМС обладали высокой устойчивостью к цитотоксическому действию криопротекторов, только

Таблица 1. Показатель жизнеспособности клеток по результатам МТТ-теста после 1,5-минутной экспозиции иМСК и сМСК с растворами ДМСО, ЭГ и 1,2-ПД

Table 1. Cell viability after 1.5-min exposure of eMSCs and sMSCs with DMSO, EG and 1,2-PD solutions (MTT test)

Клетки Cells	Концентрация, М Concentration, M	ДМСО DMSO	ЭГ EG	1,2-ПД 1,2-PD
сМСК sMSCs	1,5	81,68 ± 3,13	86,59 ± 4,39	84,8 ± 3,19
иМСК eMSCs		88,16 ± 3,08 [#]	86,66 ± 1,94	87,11 ± 2,38
сМСК sMSCs	3	77,87 ± 2,62	86,51 ± 2,36	78,15 ± 3,62 *
иМСК eMSCs		90,18 ± 2,63 [#]	88,65 ± 2,71	90,21 ± 4,19 [#]
сМСК sMSCs	5	72,51 ± 5 *	85,89 ± 2,28	65,83 ± 2,94 *
иМСК eMSCs		86,41 ± 4,22 [#]	86,59 ± 5,39	86,76 ± 6,87 [#]
сМСК sMSCs	7	20,93 ± 3,99 *	67,34 ± 4,59 *	62,68 ± 2,54 *
иМСК eMSCs		86,97 ± 6,39 [#]	86,41 ± 4,55 [#]	87,16 ± 5,35 [#]
сМСК sMSCs	9	4,06 ± 1,38 *	39,82 ± 8,9 *	6,99 ± 2,98 *
иМСК eMSCs		76,18 ± 4,09 ^{#*}	86,79 ± 3,18 [#]	85,29 ± 2,67 [#]

Примечание: * – различия значимы по отношению к показателю жизнеспособности клеток после экспозиции с криопротектором в концентрации 1,5 М ($p < 0,05$); # – различия значимы по отношению к показателю жизнеспособности клеток в суспензии после экспозиции при одинаковых условиях ($p < 0,05$).

Note: * – differences are statistically significant if compared with cell viability after exposure with cryoprotectant in 1.5 M concentration ($p < 0.05$); # – differences are statistically significant if compared with viability of cells in suspension after exposure under similar conditions ($p < 0.05$).

the control one, but still had a high level (as much as 80%). After increasing the concentrations of cryoprotectants up to 3 M, this index was not significantly different from that obtained following exposure of eMSCs and sMSCs with a 1.5 M solution (except the solution of 1,2-PD, where the number of dead cells significantly enhanced). After 1.5 min-long exposure of cells with 5 M cryoprotectant solutions the viability was not significantly different if compared with 3 M concentration of cryoprotectants: a significant reduction in viability of cells was observed after exposure in suspensions with DMSO and 1,2-PD.

The dramatic reduction in viability of sMSCs after exposure with all the studied cryoprotectants was found at 7 and 9M concentrations (Table 1). Herewith DMSO had the highest cytotoxicity at the mentioned concentrations as indicated by the index of cell viability, which was 21 and 4% respectively. Viabilities of sMSCs after exposure to 7 M solution of EG and PD were at the same level (62–67%), and at 9 M



ДМСО в концентрации 9 М значимо снижал показатель жизнеспособности клеток (табл. 1).

После 5-минутной экспозиции клеток с раствором ДМСО в концентрациях 1,5, 3 и 5 М (табл. 2) показатель жизнеспособности сМСК снизился до 70%, а при увеличении концентрации раствора ДМСО до 7 и 9 М жизнеспособные клетки практически отсутствовали. Аналогичная тенденция наблюдалась и при экспозиции иМСК, однако показатель жизнеспособности стабильно сохранялся на более высоком уровне при максимальной концентрации криопротектора (9 М) и составлял около 60%.

При экспозиции иМСК в течение 5 мин с растворами ЭГ в концентрациях до 9 М жизнеспособность клеток не снижалась и составляла 86–88%. В случае экспозиции иМСК с ЭГ в концентрации 9 М данный показатель значимо снижался, но оставался на высоком уровне (около 80%). Аналогичная динамика наблюдалась и при 5-минутной экспозиции иМСК с 1,2-ПД только с той разницей, что уровень жизнеспособности после контакта с 9 М раствором 1,2-ПД составлял 51%. В то же время значительное снижение жизнеспособности сМСК наблюдалось после экспозиции с ЭГ и 1,2-ПД в концентрации 3 М. При увеличении концентрации этих криопротекторов уровень жизнеспособности сМСК продолжал снижаться. После экспозиции с криопротекторами в концентрации 9 М жизнеспособные клетки практически отсутствовали.

Полученные данные согласуются с общим представлением о токсическом действии криопротекторов, согласно которому уровень жизнеспособности клеток снижается с увеличением времени контакта и концентрации криопротектора. Вместе с тем в настоящей работе впервые было показано снижение токсического действия криопротекторов при инкапсуляции клеток в АМС, что важно учитывать при разработке протоколов витрификации биологических объектов.

Следует полагать, что снижение токсического воздействия проникающих криопротекторов на иМСК обусловлено физическими свойствами альгинатного гидрогеля. Известно, что после полимеризации альгинатный гидрогель приобретает пористую структуру, в зависимости от концентрации

Таблица 2. Показатель жизнеспособности клеток по результатам МТТ-теста после 5-минутной экспозиции иМСК и сМСК с растворами ДМСО, ЭГ и 1,2-ПД

Table 2. Cell viability after 5-min exposure of eMSCs and sMSCs to DMSO, EG and 1,2-PD solutions (MTT test)

Клетки Cells	Концентрация, М Concentration, M	ДМСО DMSO	ЭГ EG	1,2-ПД 1,2-PD
сМСК sMSCs	1,5	78,9 ± 2,86	78,12 ± 2,48	76,13 ± 2,81
иМСК eMSCs		87,53 ± 2,46 [#]	86,94 ± 4,03 [#]	86,2 ± 2,95 [#]
сМСК sMSCs	3	72,54 ± 6,43 [*]	72,38 ± 2,51 [*]	66,77 ± 3,88 [*]
иМСК eMSCs		86,54 ± 4,16 [#]	86,8 ± 3,75 [#]	86,27 ± 2,95 [#]
сМСК sMSCs	5	70,64 ± 2,87 [*]	65,23 ± 2,38 [*]	56,96 ± 7,7 [*]
иМСК eMSCs		82,56 ± 8,42 ^{**}	86,77 ± 5,14 [#]	84,74 ± 3,58 [#]
сМСК sMSCs	7	1,28 ± 1,01 [*]	41,56 ± 8,03 ^{**}	28,83 ± 4,44 [*]
иМСК eMSCs		79,26 ± 3,77 ^{**}	84,41 ± 5,24 [#]	84,17 ± 4,6 [#]
сМСК sMSCs	9	1,56 ± 0,75 [*]	4,29 ± 1,72 [*]	2,66 ± 2,22 [*]
иМСК eMSCs		59,93 ± 4,03 ^{**}	80,56 ± 5,09 ^{**}	51,39 ± 5,73 ^{**}

Примечание: * – различия значимы по отношению к показателю жизнеспособности клеток после экспозиции с криопротектором в концентрации 1,5 М ($p < 0,05$); # – различия значимы по отношению к показателю жизнеспособности клеток в суспензии после экспозиции при одинаковых условиях ($p < 0,05$).

Note: * – differences are statistically significant if compared with cell viability after exposure with cryoprotectant in 1.5 M concentration ($p < 0.05$); # – differences are statistically significant if compared with viability of cells in suspension after exposure under similar conditions ($p < 0.05$)

concentration 1,2-PD rendered a more pronounced cytotoxic effect. At the same time the MSCs encapsulated into AMS were highly resistant to cytotoxic effect of cryoprotectants, only DMSO in 9 M concentration significantly reduced the cell viability (Table 1).

After a 5-min-long exposure of cells to DMSO solution in concentrations of 1.5, 3 and 5 M (Table 2) sMSCs viability decreased down to 70%, while increasing the concentration of DMSO solution up to 7 and 9 M the viable cells were virtually absent. A similar trend was observed when incubating the eMSCs, but the viability remained stable and high at a maximum concentration of cryoprotectant (9 M) and was about 60%.

Following exposure of eMSCs for 5 min with EG solutions at concentrations up to 9 M, the cell viability was not reduced and made 86–88%. In case of the exposure of eMSCs with EG in 9M concentration this value was significantly decreased, but remained at a high level (about 80%). A similar pattern was observed after 5 min-long exposure of eMSCs with 1,2-PD,

и вязкости альгината размер пор составляет 3,6 нм и более [6, 11, 16]. Некоторыми авторами было показано, что именно пористость альгинатного носителя влияет на обмен веществ между клетками и средой. Так, A. Lawson и соавт. [14] установили зависимость скорости проникновения веществ внутрь альгинатной микросферы от ее радиуса и пористости. Аналогичные результаты были получены A. Gautier и соавт. [10]. По их мнению, массоперенос через альгинатный гидрогель подчиняется закону диффузии Фика. Было показано, что коэффициент массопереноса витамина B₁₂ обратно пропорционален коэффициенту переноса вещества через гидрогель, который, в свою очередь, прямо пропорционален размеру АМС. В частности, для АМС диаметром 1 мм коэффициент переноса был в два раза больше, чем для капсул диаметром 0,6 мм. На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что замедление процесса массопереноса между внешней средой и инкапсулированными клетками позволяет избежать длительного контакта с высокими концентрациями криопротекторов, в результате которого наблюдается резкий осмотический и токсический ответ клеток. Однако при этом процесс насыщения клеток криопротекторами не нарушается, что позволяет успешно использовать протоколы витрификации и получать большее количество жизнеспособных клеток внутри носителя после цикла витрификации-отогрева.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о различной цитотоксичности исследованных проникающих криопротекторов, которая снижается в ряду ДМСО > 1,2-ПД > ЭГ.

Аналогичная зависимость описана в большинстве работ, посвященных исследованию цитотоксичности этих криопротекторов. Известно, что оптимальной концентрацией ДМСО для криоконсервирования МСК является 5–10%, а использование высоких концентраций (более 20%) приводит к развитию цитотоксических повреждений [17, 18, 20, 21]. Наряду с этим было показано [9, 23], что 1,2-ПД в концентрациях, необходимых для витрификации, обладает более выраженным цитотоксическим эффектом по сравнению с ЭГ. T. Herskovits и соавт. [12] установили, что 1,2-ПД в концентрации 8,5 М вызывает денатурацию более 50% белков, а для ЭГ – в концентрациях выше 11 М. M. Aue и соавт. [7] показали, что ЭГ оказывает меньшее повреждающее действие на генетический материал, чем 1,2-ПД.

Такая модификация растворов обеспечивает успешную витрификацию иМСК и других типов клеток по протоколам, разработанным для среды «ДЭПС». На основании полученных результатов

however, viability level dropped down to 51% after exposure with 9 M 1,2-PD solution. At the same time a significant reduction on sMSCs viability was observed after exposure to EG and 1,2-PD in 3 M concentration. When increasing the concentration of these cryoprotectants the viability level of sMSCs continued to decline. After exposure with cryoprotectants in 9 M concentration the viable cells were virtually absent.

These findings are consistent with the general notion about toxic effects of cryoprotectants, according to which the level of cell viability decreases with increasing a contact time and concentration of cryoprotectant. The reduced toxic effect of cryoprotectants resulted from encapsulation of cells into AMS was shown in this study for the first time, and this should be considered when developing the protocols for vitrification of biological objects.

It could be assumed that the reduction of toxic effects of penetrating cryoprotectants on eMSCs was due to physical properties of alginate hydrogel. It is known that polymerization of alginate hydrogel results in gaining porous structure. Depending on the concentration and viscosity of the alginate the pore size could be 3.6 nm or more [1, 6, 12]. Some authors have demonstrated that the very porosity of alginate carrier affects the exchange of substances between cells and medium. So, A. Lawson *et al.* [10] established that the penetration rate of substances into an alginate microsphere depended on its radius and porosity. Similar results were reported by A. Gautier *et al.* [5]. They believed the mass transfer through the alginate hydrogel to obey the Fick's law of diffusion. It has been shown that the vitamin B12 mass transfer coefficient was inversely proportional to the coefficient of the substance transfer through the hydrogel which in turn was directly proportional to the AMS size. In particular, for AMS of 1 mm diameter the transfer coefficient was two times bigger than for capsules of 0.6 mm diameter. Based on the above mentioned we can conclude that the slowing-down of mass transfer between an environment and the encapsulated cells enables the avoiding of prolonged exposure to high concentrations of cryoprotectants, which resulted in a sharp osmotic and toxic responses of cells. However, in this case the saturation of cells with cryoprotectants was not disordered, that allowed to successfully use the protocols of vitrification and to obtain bigger amount of viable cells within the carrier after the cycle of vitrification-warming.

The results of this research suggested various cytotoxicity of the investigated penetrating cryoprotectants, which was reduced in a row DMSO > 1,2-PD > EG.

A similar relationship was described in the majority of researches on the cytotoxicity of these cryopro-



можно сделать предположение, что основная часть многокомпонентного витрифицирующего раствора должна приходиться на ЭГ, а 1,2-ПД и ДМСО могут выступать в роли вспомогательных веществ или вообще отсутствовать.

Выводы

Инкапсуляция в альгинатные микросферы позволяет минимизировать время контакта с высокими концентрациями криопротекторов, ведущего к развитию резкого осмотического и токсического ответа клеток на такие концентрации криопротекторов. Однако при этом процесс насыщения клеток криопротекторами не нарушается.

Показано, что цитотоксичность криопротекторов относительно ИМСК снижается в ряду ДМСО > 1,2-ПД > ЭГ.

Сделано предположение, что при создании многокомпонентных витрифицирующих растворов в качестве основного вещества целесообразно использовать ЭГ, а 1,2-ПД и ДМСО могут находиться в незначительном количестве или вообще отсутствовать.

Литература

1. Горохова Н.А., Петренко Ю.А., Петренко А.Ю. Выбор криозащитной среды для витрификации суспензии эмбриональных фибробластоподобных клеток // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №1. – С. 50–59.
2. Зайков В.С., Петренко Ю.А., Труфанова Н.А. и др. Влияние криоконсервирования путем медленного замораживания или витрификации на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток, заключенных в альгинатные сферы диаметром более 1 мм // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №3. – С. 222–230.
3. Зайков В.С., Петренко Ю.А., Труфанова Н.А. и др. Особенности витрификации мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №4. – С. 14–20.
4. Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Мазур С.П. Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // Трансплантология. – 2007. – Т. 9, №1. – С. 218–220.
5. Правдюк А.И., Петренко Ю.А., Волкова Н.А., Петренко А.Ю. Свойства мезенхимальных стромальных клеток человека при инкапсуляции в альгинатные микросферы // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, №2. – С. 62–70.
6. Augst A.D., Kong H.J., Mooney D. J. Alginate hydrogels as biomaterials // *Macromolecular Bioscience*. – 2006. – Vol. 6, №8. – P. 623–633.
7. Aye M., Di Giorgio C., De Mo M. et al. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol // *Food and Chemical Toxicology*. – 2010. – Vol. 48, №7. – P. 1905–1912.
8. Bernas T., Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes // *Cytometry*. – 2002. – Vol. 47, №4. – P. 236–242.

It is known that the optimum concentration of DMSO to cryopreserve MSCs is 5–10% and the use of higher concentrations (over 20%) leads to the development of cytotoxic injury [13, 14, 16, 19].

Along with this it has been shown [4, 21], that 1,2-PD in the concentrations necessary for vitrification had a pronounced cytotoxic effect compared with EG. T. Herskovits *et al.* [8] found that 1,2-PD in 8.5 M concentration caused the denaturation of more than 50% proteins, and in case of EG the critical concentrations were above 11%. M. Aye *et al.* [2] showed that EG had less damaging effect on genetic material if compared with 1,2-PD.

This modification of the solutions provides a successful vitrification of eMSCs and other cell types under the protocols developed for the DEPS mixture. On the base of the findings we can assume that the bulk of the multi-component vitrifying solution should comprise EG, but 1,2-PD and DMSO can either act as additives or to be absent at all.

Conclusions

Encapsulation into alginate microspheres enables minimizing the contact time with high concentrations of cryoprotectants, leading to the development of abrupt osmotic and toxic responses of cells to these concentrations of cryoprotectants. However, in this case the saturation of cells with cryoprotectants is not disordered.

The cytotoxicity of cryoprotectants in respect of eMSCs has been shown to be reduced in the row DMSO > 1,2-PD > EG.

It has been suggested that when creating a multi-component vitrifying solution the EG should be used as the main substance and 1,2-PD and DMSO may be either in small quantities or absent at all.

References

1. Augst A.D., Kong H.J., Mooney D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular bioscience* 2006; 6(8): 623–633.
2. Aye M., Di Giorgio C., De Mo M. et al. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48(7): 1905–1912.
3. Bernas T., Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 2002; 47(4): 236–242.
4. Fahy G. M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 23(1): 1–13.
5. Gautier A., Carpentier B., Dufresne M. et al. Impact of alginate type and bead diameter on mass transfers and the metabolic activities of encapsulated c3a cells in bioartificial liver applications. *European Cells and Materials* 2011; 21(25): 94–106.
6. Goedert M., Mobed-Miremadi M. Cross-linked alginate film pore size determination using atomic force microscopy and validation



9. Fahy G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology // *Cryobiology*. – 1986. – Vol. 23, №1. – P. 1–13.
10. Gautier A., Carpentier B., Dufresne M. et al. Impact of alginate type and bead diameter on mass transfers and the metabolic activities of encapsulated c3a cells in bioartificial liver applications // *European Cells and Materials*. – 2011. – Vol. 21, №25. – P. 94–106.
11. Goedert M., Mobed-Miremedi M. Cross-linked alginate film pore size determination using atomic force microscopy and validation using diffusivity // *J. Surf. Eng. Mat. Adv. Techn.* – 2013. – Vol. 2013, №4. – P. 1–12.
12. Herskovits T.T., Gadegbeku B., Jaillet H. On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols // *J. Biol. Chem.* – 1970. – Vol. 245, №10. – P. 2588–2598.
13. Kuleshova L.L., Gouk S.S., Hutmacher D.W. Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28, №9. – P. 1585–1596.
14. Lawson A., Mukherjee I., Sambanis A. Mathematical modeling of cryoprotectant addition and removal for the cryopreservation of engineered or natural tissues // *Cryobiology*. – 2013. – Vol. 64, №1. – P. 1–11.
15. Lawson A., Ahmad H., Sambanis A. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions // *Cryobiology*. – 2011. – Vol. 62, №2. – P. 115–22.
16. Leal-Egana A., Dietrich-Braumann U., Diaz-Cuenca A. et al. Determination of pore size distribution at the cell-hydrogel interface // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2011. – Vol. 9, №1. – P. 24–32.
17. Marquez-Curtis A., Janowska-Wieczorek A., McGann L., J. Elliot Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: biological, clinical and cryopreservation aspects // *Cryobiology*. – 2015. – Vol. 71, №2. – P. 181–197.
18. Morris C., de Wreede L., Scholten M. et al. Should the standard dimethyl sulfoxide concentration be reduced? Results of a European Group for Blood and Marrow Transplantation prospective noninterventional study on usage and side effects of dimethyl sulfoxide // *Transfusion*. – 2014. – Vol. 54, №10. – P. 2514–22.
19. Murua A., Portero A., Orive G. et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. // *J. Contr. Release*. – 2008. – Vol. 132, №2. – P. 76–83.
20. Ock S., Rho G. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (PMSCS) // *Cell Transplantation*. – 2011. – Vol. 20, №8. – P. 1231–1239.
21. Rowley S., Anderson G. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells // *Bone Marrow Transplant*. – 1993. – Vol. 11, №5. – P. 389–393.
22. Simpson N., Grant S., Gustavsson L. et al. Biochemical consequences of alginate encapsulation: a NMR study of insulin-secreting cells // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27, №12. – P. 2577–2586.
23. Taniguchi M., Arikawa R., Kaedei Y. et al. Effects of cryoprotectant agents and equilibration methods on developmental competence of porcine oocytes // *Cryoletters*. – 2011. – Vol. 32, №5. – P. 410–422.
24. Wusteman M., Pegg D., Robinson M. et al. Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties // *Cryobiology*. – 2002. – Vol. 44, №1. – P. 24–37.
25. Zimmermann H., Shirley S., Zimmermann U. Alginate-based encapsulation of cells: past, present, and future // *Current Diabetes Reports*. – 2007. – Vol. 7, №4. – P. 314–320.
7. Gorokhova N.A., Petrenko Yu.A., Petrenko A.Yu. Search of cryoprotective medium for vitrification of fetal fibroblastlike suspension cells. *Problems of Cryobiology* 2007; 17(1): 50–59.
8. Herskovits T.T., Gadegbeku B., Jaillet H. On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. *J Biol Chem* 1970; 245(10): 2588–2598.
9. Kuleshova L.L., Gouk S.S., Hutmacher D.W. Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs. *Biomaterials* 2007; 28(9): 1585–1596.
10. Lawson A., Mukherjee I., Sambanis A. Mathematical modeling of cryoprotectant addition and removal for the cryopreservation of engineered or natural tissues. *Cryobiology* 2013; 64(1): 1–11.
11. Lawson A., Ahmad H., Sambanis A. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions. *Cryobiology* 2011; 62(2): 115–122.
12. Leal-Egana A., Dietrich-Braumann U., Diaz-Cuenca A. et al. Determination of pore size distribution at the cell-hydrogel interface. *Journal of Nanobiotechnology* 2011; 9(1): 24–32.
13. Marquez-Curtis A., Janowska-Wieczorek A., McGann L., J. Elliot Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology* 2015; 71(2): 181–197.
14. Morris C., de Wreede L., Scholten M. et al. Should the standard dimethyl sulfoxide concentration be reduced? Results of a European Group for Blood and Marrow Transplantation prospective noninterventional study on usage and side effects of dimethyl sulfoxide. *Transfusion* 2014; 54(10): 2514–2522.
15. Murua A., Portero A., Orive G. et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *Journal of Controlled Release* 2008; 132(2): 76–83.
16. Ock S., Rho G. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (PMSCS). *Cell Transplantation* 2011; 20(8): 1231–1239.
17. Petrenko A.Yu., Mazur S.P., Petrenko Yu.A. et al. Isolation and multilineage differentiation of stromal cells from human fetal and adult tissue. *Transplantologiya* 2007; 9(1): 218–220.
18. Pravdyuk A.I., Petrenko Yu.A., Volkova N.A. et al. Properties of mesenchymal stromal human cells encapsulated in alginate microbeads. *Biotechnologiya* 2010; 3(2): 62–70.
19. Rowley S., Anderson G. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplantation* 1993; 11(5): 389–393.
20. Simpson N., Grant S., Gustavsson L. et al. Biochemical consequences of alginate encapsulation: a NMR study of insulin-secreting cells. *Biomaterials* 2006; 27(12): 2577–2586.
21. Taniguchi M., Arikawa R., Kaedei Y. et al. Effects of cryoprotectant agents and equilibration methods on developmental competence of porcine oocytes. *Cryoletters* 2011; 32(5): 410–422.
22. Zaikov V.S., Petrenko Yu.A., Trufanova N.A. et al. Effect of cryopreservation using slow freezing or vitrification on viability and metabolic activity of mesenchymal stromal cells encapsulated within alginate spheres with diameter of 1 mm and more. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2014; 24(3): 222–230.
23. Zaikov V.S., Petrenko Yu.A., Trufanova N.A. et al. Vitrification of mesenchymal stromal cells in alginate microbeads. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2012; 22(4): 14–20.
24. Wusteman M., Pegg D., Robinson M. et al. Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties. *Cryobiology* 2002; 44(1): 24–37.
25. Zimmermann H., Shirley S., Zimmermann U. Alginate-based encapsulation of cells: past, present, and future. *Current diabetes reports* 2007; 7(4): 314–320.

