

Особенности витрификации мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер

UDC 611.018.46.085.23

V.S. ZAYKOV*, YU.A. PETRENKO, N.A. TRUFANOVA, A.I. PRAVDYUK, A.YU. PETRENKO

Vitrification of Mesenchymal Stromal Cells in Alginate Microbeads

Криоконсервирование клеток, инкапсулированных в альгинатные микросферы, является одним из актуальных вопросов тканевой инженерии. В представленной работе изучалось влияние времени экспозиции с мультикомпонентным раствором криопротекторов ДЭПС-1 (10% ДМСО, 20% ЭГ, 20% 1,2-ПД и 0,5 М сахарозы) на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток (МСК) после витрификации в составе альгинатных микросфер. Было показано, что использование мультикомпонентного раствора криопротекторов и ступенчатой экспозиции позволяет проводить успешное криоконсервирование методом витрификации МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы. Особенностью витрификации МСК в составе микросфер по сравнению с клетками в суспензии является более продолжительная экспозиция в растворе криопротекторов.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, альгинатные микросферы, витрификация, мультикомпонентный раствор криопротекторов, ступенчатое добавление криопротекторов.

Криоконсервування клітин, інкапсульованих в альгінатні мікросфери, є одним з актуальних питань тканинної інженерії. У представленій роботі вивчався вплив часу експозиції з мультикомпонентним розчином криопротекторів ДЕПС-1 (10% ДМСО, 20% ЕГ, 20% 1,2-ПД і 0,5 М сахарози) на життєздатність і метаболічну активність мезенхімальних стромальних клітин (МСК) після вітрифікації в складі альгінатних мікросфер. Було показано, що використання мультикомпонентного розчину криопротекторів та ступінчастої експозиції дозволяє проводити успішне криоконсервування методом вітрифікації МСК, інкапсульованих в альгінатні мікросфери. Особливістю вітрифікації МСК у складі мікросфер у порівнянні з клітинами у суспензії є більш триваліша експозиція у розчині криопротекторів.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, альгінатні мікросфери, вітрифікація, мультикомпонентний розчин криопротекторів, ступінчасте додавання криопротекторів.

Cryopreservation of cells encapsulated in alginate microbeads is one of the important issues of tissue engineering. The present study was directed on the estimation of the effect caused by of duration of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells (MSCs) exposure in multicomponent cryoprotective solution DEPS-1 (10% DMSO, 20% EG, 20% 1,2-PD and 0.5 M sucrose) on survival and metabolic activity after vitrification and rewarming. It was shown using of multicomponent cryoprotective solution and stepwise exposure allowed to achieve successful cryopreservation by means of vitrification of MSCs encapsulated in alginate microspheres. The main difference between vitrification of MSCs encapsulated in microspheres vs. single cells was the longer exposure with CPA.

Key words: mesenchymal stromal cells, alginate microbeads, vitrification, multicomponent cryoprotective solution, step-wise exposure.

Инкапсуляция в альгинатные микросферы позволяет обеспечить надежную иммобилизацию и иммуноизоляцию клеток при трансплантации, а также обмен веществ между клетками и средой [4, 16, 21]. Одним из перспективных объектов инкапсуляции в альгинатные микросферические носители являются мезенхимальные стромальные клетки (МСК) человека, что обусловлено их высокой пролиферативной активностью, мультилинейным дифференцировочным потенциалом и низкой иммуногенностью [3, 5, 12, 18]. Благодаря этим уникальным свойствам, инкапсулированные МСК (иМСК) все чаще используются в клеточной биотехнологии, тканевой инженерии и трансплантологии [4]. Но для разработки новых и усовершенствованных

Encapsulation in alginate microbeads enables to provide a reliable immobilization and immune isolation of cells during transplantation as well as to maintain optimal exchange of substances between cells and medium [4, 16, 21]. One of the prospective objects of encapsulation into alginate microbead carriers are human mesenchymal stromal cells (MSCs), which are characterized by a high proliferative activity, multilineage differentiation potential and low immunogenicity [3, 5, 12, 18]. Due to these unique properties, encapsulated MSCs (eMSCs) are often used in cell biotechnology, tissue engineering and transplantology [4]. To establish a low temperature bank of eMSCs it is necessary to develop new or improve the existing methods of eMSC cryopreservation.

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. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
zaykov.vedeney@gmail.com

* To whom correspondence should be addressed: 23,
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 41
35, fax: +380 57 373 3084, e-mail: zaykov.vedeney@gmail.com

вания существующих методов криоконсервирования и МСК необходимо создать банк и МСК.

Методы криоконсервирования, основанные на медленном замораживании, направлены на то, чтобы исключить образование внутриклеточного льда за счет выхода воды из клетки и ее кристаллизацию в окружающей среде [1]. Альтернативой медленному замораживанию являются методы, основанные на процессе витрификации, которые позволяют исключить внутри- и внеклеточную кристаллизацию. Согласно G.M. Fahy [8] использование медленного замораживания для криоконсервирования биологических объектов уступает методу витрификации по показателям выживаемости после замораживания-отогрева. Так как при медленном замораживании внеклеточная кристаллизация способна влиять на структуру носителя, это может привести к гибели клеток.

В литературе достаточно широко освещены подходы к витрификации единичных клеток [2, 6, 19, 20], а также тканей и органов [7, 9, 17]. Вместе с тем исследования по витрификации клеток в составе тканеинженерных конструкций начали проводить лишь в последнее время. Так, описаны способы витрификации инсулинпродуцирующих клеток линии β TC3 [15], клеток костного мозга [10] и гепатоцитов [11] в составе альгинатных микросфер, а также остеобластов в пористых носителях на основе гидроксиапатита [13]. Вопрос о витрификации МСК в составе различных биоинженерных конструкций, в частности инкапсулированных в альгинатные микросферы, остается открытым.

Ранее нами были разработаны условия витрификации суспензии МСК [2], которые позволили значительно сохранить метаболическую активность клеток, способность к адгезии, пролиферации и дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях. Метод витрификации включал два этапа экспозиции с раствором криопротекторов ДЭПС-1, содержащим 10% ДМСО, 20% ЭГ, 20% 1,2-ПД и 0,5 М сахарозы [2]. Однако не ясно, будут ли эти условия обеспечивать сохранность биологических свойств МСК после витрификации в составе альгинатных микросфер.

Цель работы – изучить влияние витрификации с использованием мультикомпонентного раствора криопротекторов ДЭПС-1 на сохранность и метаболическую активность МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы.

Материалы и методы

Мезенхимальные стромальные клетки выделяли из дермы взрослого человека методом эксплантации кусочков кожи [3], которые получали от взрослых доноров только с их письменного согла-

Cryopreservation methods based on slow freezing are directed to avoid the intracellular ice formation due to outflow of intracellular water and its following crystallization outside the cell [1]. Vitrification, which allow to exclude both intra- and extracellular crystallization is an alternative to slow freezing. According to Fahy [8] the application of slow freezing for cryopreservation of biological objects is inferior to vitrification by the post-thaw survival indices. The extracellular crystallization during slow freezing can affect carrier structure and may result in a cell death.

There are numerous reports on the vitrification of single cells [2, 6, 19, 20] as well as tissues and organs [7, 9, 17]. However, only recently there were undertaken the investigations of the vitrification of cells within tissue engineered constructs. The approaches for vitrification of insulin-producing β TC3 cells [15], bone marrow cells [10] and hepatocytes within alginate microbeads as well as osteoblasts in hydroxyapatite porous scaffolds have been described [13]. However, the question of MSCs vitrification within different bioengineered constructs, particularly encapsulated in alginate microbeads, remained open.

Previously we developed the protocol for the vitrification of MSC suspension [2], which enabled to preserve metabolic activity of cells, as well as its ability to adhesion, proliferation and osteogenic and adipogenic differentiation. The vitrification protocol included two steps of exposure with cryoprotective solution DEPS-1, containing 10% DMSO, 20% EG, 20% 1,2-PD and 0.5 M sucrose [2]. However, it was not clear if these conditions would provide the preservation of biological properties of MSCs within alginate microbeads after vitrification and rewarming.

The aim of the research was to study the effect of vitrification using multicomponent cryoprotective solution DEPS-1 on the integrity and metabolic activity of MSCs encapsulated in alginate microbeads.

Materials and methods

Mesenchymal stromal cells were derived from adult human dermis by tissue explants method [3]. Tissue fragments were obtained from adult donors only after their written informed consent. Cells were cultured in medium α -MEM (Sigma, USA) supplemented by 10% fetal bovine serum (Biolot, Russia), 2 mM of *L*-glutamine, 50 U/ml of penicillin and 50 mg/ml of streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity.

Cell encapsulation was performed by the method described by A.I. Pravdyuk *et al.* [4]. Briefly, mesenchymal stromal cells of 2–3 passage after achievement of 60–70% confluence were trypsinized by the standard method and centrifuged at 200g for 7 min. The obtained sediment was resuspended in 1.2% purified solution of sodium alginate (Sigma) afterwards suspen-

сия. Культивирование клеток проводили в среде α -МЕМ («Sigma», США), дополненной 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота («Биолот», Россия), 2 мМ *L*-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Инкапсуляцию клеток проводили по методике, описанной А.И. Правдюком и соавт. [4]. Мезенхимальные стромальные клетки 2–3 пассажа после достижения 60–70% конfluence в монослое трипсинизировали по стандартной методике и осаждали центрифугированием при 200g в течение 7 мин. Полученный осадок ресуспендировали в очищенном 1,2%-м растворе альгината натрия («Sigma»), после чего суспензию покапельно вносили в раствор 100 мМ CaCl₂ на 10 мин для полимеризации. Полученные иМСК отмывали физиологическим буфером, содержащим 0,9% NaCl и 25 мМ HEPES, и использовали для дальнейших экспериментов.

Для витрификации иМСК применяли метод, описанный в [2]. В криопробирку («Nunc», США), содержащую микросферы и 100 мкл буфера, вносили 100 мкл раствора ДЭПС-1 и осуществляли первый этап экспозиции, затем добавляли 800 мкл ДЭПС-1 и выполняли второй этап. Экспозицию проводили при комнатной температуре, ее продолжительность изменялась в зависимости от экспериментальной группы. Затем образцы погружали в жидкий азот на 30 с и выдерживали в парах азота при температуре около –145°C в течение 5 мин, после чего снова погружали в жидкий азот для хранения.

Образцы отогревали на водяной бане при температуре 40°C. Инкапсулированные МСК отмывали от раствора криопротекторов, помещая в раствор 0,5 М сахарозы, и затем пошагово разводили средой Игла (ГУП ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Россия).

Сохранность иМСК после витрификации-отогрева оценивали с помощью двойного окрашивания флуоресцеиндиацетатом (ФДА) и этидиумбромидом (ЭБ). Окрашенные клетки подсчитывали с помощью флуоресцентного микроскопа («CETI», Великобритания), как было описано в работе [4].

Количество метаболически активных МСК в составе микросфер после витрификации-отогрева оценивали с помощью МТТ-теста. Для этого через 48 ч культивирования после отогрева иМСК в течение 2 ч инкубировали в среде, содержащей 5 мг/мл МТТ. Клетки, накопившие формазан, подсчитывали с помощью светового микроскопа («CETI»). Метаболическую активность определяли как отношение количества клеток, накопивших формазан, к общему количеству клеток.

sion was introduced by drop wise manner into 100 mM of CaCl₂ solution and incubated during 10 min for polymerization. The derived eMSCs were washed with physiological buffer, containing 0.9% NaCl and 25 mM HEPES and used for further experiments.

The vitrification of eMSC was performed by the method of Gorokhova *et al.* [2]. Briefly, 100 μ l of DEPS-1 solution were added into cryotubes (Nunc, USA), containing microbeads in 100 μ l of buffer. After the first exposure stage 800 μ l of DEPS-1 solution were added and the second exposure stage was performed. Exposure was carried-out at the room temperature; its duration varied depending on the experimental group. The samples were plunged into liquid nitrogen for 30 sec and exposed in nitrogen vapors at –145°C for 5 min and afterwards plunged into liquid nitrogen for storage.

The samples were thawed in water bath at 40°C. Encapsulated eMSCs were washed free of cryoprotectant solution by placing them into solution of 0.5 M sucrose solution followed by stepwise dilution with Eagle's medium (Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides of Russian Academy of Medical Sciences, Russia).

Integrity of eMSCs after vitrification and rewarming was evaluated by fluorescein diacetate (FDA) and ethidium bromide (EB) double staining. The stained samples were analyzed using fluorescent microscope (CETI, UK) [4].

The number of metabolically active eMSCs after vitrification-rewarming was evaluated by MTT-test. Briefly, the rewarmed eMSCs were cultured during after 48 hrs and thereafter incubated for 2 hrs in the medium containing 5 mg/ml MTT. The cells accumulated formazan were calculated using transmitted light microscope (CETI). Metabolic activity was determined as a ratio of formazan positive cells number and the total cell number. The indices of integrity and metabolic activity of eMSCs before vitrification served as the control.

The statistical processing of obtained results and the significance estimation was performed by parametric method of statistical analysis (Student's t-criterion) using Origin 6.7 software.

Results and discussion

Some approaches of vitrification of the cells encapsulated in alginate microbeads have been described previously [10, 11, 13, 15]. These approaches were usually based on the several stages of sample exposure in multicomponent solutions of cryoprotectants. A common trend was the stepwise increase of the cryoprotectants concentration in the mixture at each stage of exposure with corresponding reduction of the duration of contact with the cryoprotectant. The main task of

Контролем служили показатели сохранности и метаболической активности иМСК после инкапсуляции.

Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет программ «Origin 6.7», для оценки достоверности полученных данных - параметрический метод статистического анализа (t-критерий Стьюдента).

Результаты и обсуждение

В литературе описаны некоторые подходы к витрификации клеток, инкапсулированных в альгинатные микросферы [10, 11, 13, 15]. Основой этих подходов являются использование многокомпонентных растворов криопротекторов и проведение нескольких этапов экспозиции образцов в криозащитной среде. При этом общим является ступенчатое увеличение концентрации криозащитной смеси на каждом этапе экспозиции, а также соответствующее уменьшение времени контакта с криопротектором. Основной задачей исследователей было определение оптимального состава раствора криопротекторов, а также количества этапов экспозиции и их продолжительности.

Ранее нами были разработаны условия витрификации суспензии МСК под защитой раствора криопротекторов ДЭПС-1 [2]. Установлено, что для успешной витрификации необходимо проводить два этапа экспозиции клеток в растворе криопротекторов: на первом – в 50%-м растворе криопротекторов в течение 1 мин, на втором – в 100%-м растворе 15–20 с. В результате удалось добиться высокого уровня сохранности суспензии МСК после витрификации-отогрева ($70,6 \pm 2,8\%$ по окрашиванию трипановым синим).

Поскольку объектом настоящего исследования являлись иМСК, то для их витрификации был опробован метод, хорошо зарекомендовавший себя при витрификации этих клеток в виде суспензии [2]. Простое повторение условий данного метода приводило к гибели МСК, заключенных в альгинатные микросферы, что, возможно, связано с тем, что времени экспозиции в криозащитном растворе, достаточного для успешной витрификации единичных клеток, не достаточно для клеток, инкапсулированных в альгинатный носитель. Из этого следует, что для достижения успешной витрификации иМСК необходимо было модифицировать данный метод. С этой целью на основе предварительных экспериментов были сформированы четыре экспериментальные группы, отличающиеся по времени экспозиции образцов в растворе криопротекторов ДЭПС-1 на первом и втором этапах (таблица).

Для оценки сохранности иМСК после криоконсервирования проводили двойное окрашивание ФДА/ЭБ образцов каждой группы.

researchers was to determine the optimal composition of cryoprotectant solution as well as a number of exposure stages and their duration.

Previously we have studied the conditions for MSC suspensions vitrification under the protection of DEPS-1 cryoprotective solution [2]. It was established that successful vitrification required the performance of two stages of cell exposure in cryoprotective solution: at the first stage the cells were exposed to 50% cryoprotective solution for 1 min, and at the second stage lasted 15–20 sec in 100% solution. The use of this approach enabled to achieve high integrity level of MSCs suspension after vitrification-rewarming ($70.6 \pm 2.8\%$ by trypan blue staining).

Since this research was performed with eMSCs, we have chosen the method which was shown to be effective for vitrification of these cells as the suspension [2]. Simple reproduction of the conditions required by the mentioned method resulted in death of the MSCs encapsulated in alginate microbeads, that could proceed from the duration of exposure in the cryoprotectant solution, sufficient to achieve the successful vitrification of single cells, however, insufficient for cells encapsulated in alginate carriers. Thus, to achieve a successful vitrification of eMSCs, the modification of this method was needed. Based on the previous experiments we formed four experimental groups, which differed by time of samples exposure in cryoprotective solution DEPS-1 at the 1st and 2nd stages (Table).

To evaluate the integrity of eMSCs after cryopreservation we performed FDA/EB double staining of samples from each group.

It was found, that vitrification resulted in a significant reduction of integrity of eMSCs by 29–53% depending on exposure time (Fig. 1). The most expressed decrease in integrity was observed in the groups 3 and 4, where the duration of the second exposure stage was 45 sec. In this case the integrity was 47.21 ± 1.8 and $51.25 \pm 3.34\%$, correspondingly, which differed

Продолжительность этапов экспозиции иМСК с раствором криопротекторов ДЭПС-1
Duration of exposure stages of eMSCs in cryoprotective solution DEPS-1

Этапы Stages	Продолжительность этапа Stage duration			
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4
1-й этап (50% ДЭПС-1) 1st stage (50% DEPS-1)	2 мин 15 с 2 min 15 s	2 мин 30 с 2 min 30 s	2 мин 15 с 2 min 15 s	2 мин 30 с 2 min 30 s
2-й этап (100% ДЭПС-1) 2nd stage (50% DEPS-1)	30 с 30 s	30 с 30 s	45 с 45 s	45 с 45 s

Рис. 1. Влияние времени экспозиции в растворе криопротекторов ДЭПС-1 на сохранность иМСК после витрификации-отогрева ($n = 8$); * – различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению к контролю до криоконсервирования; # – различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению к группам 1 и 2.

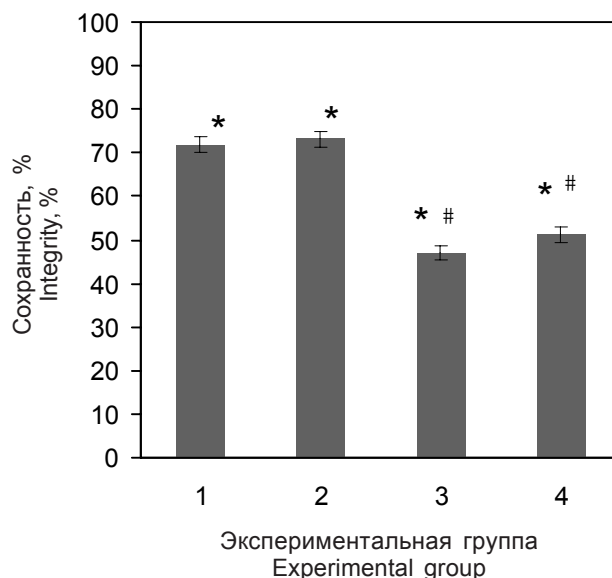
Fig. 1. Effect of exposure time in cryoprotective solution DEPS-1 on the integrity of eMSCs after vitrification-rewarming ($n = 8$); * – differences are significant ($p < 0.05$) relative to the control prior to cryopreservation; # – differences are significant ($p < 0.05$) relative to the groups 1 and 2.

Витрификация приводила к достоверному снижению уровня сохранности иМСК на 29–53% в зависимости от времени экспозиции (рис. 1), наиболее выражено снижение в группах 3 и 4, где продолжительность второго этапа экспозиции была 45 с. В данном случае сохранность составляла $47,21 \pm 1,8$ и $51,25 \pm 3,34\%$ соответственно и достоверно отличалась от групп 1 и 2 ($71,87 \pm 2,0$ и $73,12 \pm 1,8\%$). Из рис. 1 следует, что продолжительность первого этапа несущественно влияет на уровень сохранности, а решающее значение имеет время экспозиции на втором этапе. Хотя значения сохранности в группах 1 и 2 были выше, чем в группах 3 и 4, они были достоверно ниже уровня контроля.

При оценке метаболической активности клеток с использованием МТТ-теста через 48 ч после витрификации-отогрева наблюдалась схожая динамика с результатами окрашивания ФДА/ЭБ, однако показатели были ниже (рис. 2). Видно, что метаболическая активность в группах 3 и 4 была достоверно ниже, чем в группах 1 и 2, что подтверждает негативное влияние продолжительного (более 30 с) контакта иМСК с раствором криопротекторов на втором этапе экспозиции, которое наблюдалось при окрашивании ФДА/ЭБ. Кроме того, использование МТТ-теста позволило оценить влияние времени экспозиции клеток в растворе криопротекторов на первом этапе, что не удавалось при оценке сохранности клеток с помощью ФДА/ЭБ. Так, было отмечено, что экспозиция клеток в растворе ДЭПС-1 в течение 2 мин 30 с на первом этапе (группы 2 и 4) приводила к более полному сохранению метаболической активности иМСК после витрифика-

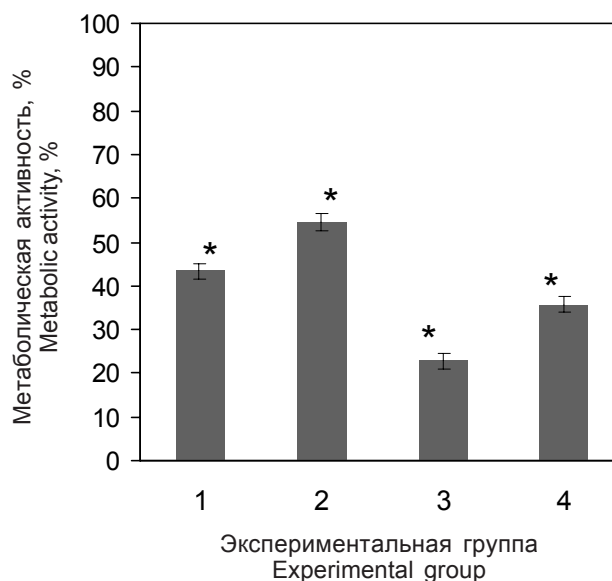
Рис. 2. Влияние времени экспозиции в растворе криопротекторов ДЭПС-1 на метаболическую активность иМСК после витрификации-отогрева ($n = 8$); все приведенные данные достоверно отличаются друг от друга и от уровня контроля ($p < 0,05$).

Fig. 1. Effect of exposure time in cryoprotectant solution DEPS-1 on metabolic activity of eMSCs after vitrification-rewarming ($n = 8$); all the presented data are significantly different from each other and the control level ($p < 0.05$).



significantly from data of groups 1 and 2 (71.87 ± 2.0 and $73.12 \pm 1.8\%$). Fig. 1 shows that the duration of the first stage insignificantly affects the integrity of cells, while the exposure time at the second stage has a crucial effect. Although values of integrity in the groups 1 and 2 were higher than in 3 and 4 ones, they were significantly lower compared to the control (prior to vitrification).

The evaluation of cell metabolic activity using MTT-test in 48 hrs after vitrification-rewarming showed the dynamics similar to FDA/EB staining results, however the indices were lower (Fig. 2). The metabolic activity in groups 3 and 4 was significantly lower than in groups 1 and 2, confirming the negative effect of continuous (more than 30 sec) contact of eMSCs with cryoprotective solution at the second stage of exposure, found also by FDA/EB staining. Moreover, the application



ции-отогрева, по сравнению с группами 1 и 3, где длительность экспозиции составляла 2 мин 15 с. Наиболее высокая метаболическая активность клеток была достигнута в группе 2 ($54,7 \pm 1,9\%$), наименьшая – в группе 3 ($22,8 \pm 1,7\%$), где время экспозиции составляло 2 мин 15 с на первом этапе и 45 с – на втором. Аналогичная динамика отмечалась R. Malpique и соавт. [14]: сохранность МСК, оцененная непосредственно после замораживания-отогрева, была значительно выше, чем через 24 ч культивирования. Вполне естественно, что результаты, полученные с помощью МТТ-теста, являются более информативными, поскольку окрашивание ФДА/ЭБ выявляет только клетки с нарушением целостности плазматической мембраны, а МТТ-тест – метаболически активные клетки.

В данной работе показано достоверное снижение как сохранности, так и метаболической активности в группах 3 и 4. Такая же зависимость была отмечена в работе L. Kuleshova и соавт. [11]: жизнеспособность гепатоцитов достоверно снижалась при продолжительном контакте с раствором криопротекторов на последнем этапе экспозиции. Это указывает на то, что при длительном контакте и МСК с раствором криопротекторов на втором этапе проявляется токсический эффект криопротекторов, входящих в состав криозащитной смеси, приводящий к гибели клеток.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения витрификации для сохранения свойств МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы.

Выводы

Показано, что и МСК, криоконсервированные методом витрификации под защитой раствора криопротекторов ДЭПС-1, имеют высокий уровень сохранности и метаболической активности. Для насыщения МСК в составе микрофер криозащитным раствором ДЭПС-1 требуется более продолжительная экспозиция в растворе криопротекторов, чем для клеток в суспензии. Следует полагать, что для успешной витрификации клеток в составе более крупных биоинженерных конструкций и фрагментов тканей потребуются еще более длительная экспозиция в растворах криопротекторов.

Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наукова думка, 1994. – 142 с.
2. 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. 71–79.

of MTT-test enabled to evaluate the effect of the first stage exposure duration on the metabolic activity of cells, which was impossible using the FDA/EB test for assessing cell integrity. Thus, it was noted that cell exposure in DEPS-1 for 2 min and 30 sec at the first stage (groups 2 and 4) resulted in more effective preservation of metabolic activity of eMSCs after vitrification-rewarming in comparison to the groups 1 and 3, where the exposure duration made 2 min and 15 sec. The highest metabolic activity of cells was achieved in group 2 ($54.7 \pm 1.9\%$), the lowest one was found in group 3 ($22.8 \pm 1.7\%$), where exposure time at the first stage was 2 min and 15 sec and at the second one was 45 sec. A similar dynamics was observed by Malpique *et al.* [14], *i. e.* MSCs integrity evaluated immediately after freeze-thawing was significantly higher than after 24 hrs of culturing. It is obviously that the results obtained with MTT-test are more informative because the latter allows assessing the number of metabolically active cells, while FDA/EB staining reveals only the cells with damaged plasma membrane.

Our study showed the significant reduction both of the integrity and metabolic activity of cells in the groups 3 and 4. Similar dependence was described by Kuleshova *et al.* [11], it has been noted that hepatocytes viability was significantly reduced after long-term contact with cryoprotective solution at the last stage of exposure. This indicates that continuous contact of eMSCs with cryoprotectant solution at the second stage causes a toxic effect of the cryoprotectants comprising the solution, which could lead to death of the cells.

Thus, the obtained results confirm the vitrification as a promising method allowing to preserve the properties of MSCs encapsulated in alginate microbeads.

Conclusions

It was shown that eMSCs cryopreserved by vitrification under protection of cryoprotective solution DEPS-1 had high levels of integrity and metabolic activity. To saturate MSCs within microbeads with cryoprotective solution DEPS-1 a longer exposure in cryoprotective solution is required, if compared to cells in suspension. It could be suggested that the successful vitrification of cells within larger bioengineered constructs and tissue fragments requires longer exposure in cryoprotective solutions.

References

1. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low-temperature preservation of cell suspensions. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 142 p.
2. Gorokhova N.A., Petrenko Yu.A., Petrenko A.Yu. Search of cryoprotective medium for vitrification of fetal fibroblast-like cell suspension // Problems of Cryobiology. – 2007. – Vol. 17, N1. – P. 71–79.

3. Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Мазур С.П. и др. Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // Трансплантология. – 2007. – Т. 9, №1. – С.218–220.
4. 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.
5. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // Blood. – 2005. – Vol. 105, №4. – P. 1815–1822.
6. Cai X.Y., Chen G.A., Lian Y. et al. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20, №7. – P. 1969–1974.
7. de Graaf I., Draaisma A., Schoeman O. et al. Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification // Cryobiology. – 2007. – Vol. 54, №1. – P. 1–12.
8. Fahy G.M. Vitrification. Emerging applications and engineering contributions. // Low temperature biotechnology. – 1988. – Vol. 10, №6 – P. 113–146.
9. Fahy G.M., Wowk B., Wu J. et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48, №2. – P. 78–157.
10. Gajadhar B., Kong L., Raquel M. et al. Cryopreservation of alginate-fibrin beads involving bone marrow derived mesenchymal stromal cells by vitrification // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30, №2. – P. 336–343.
11. Kuleshova L., Wang W., Wu Y. et al. Vitrification of encapsulated hepatocytes with reduced cooling and warming rates // CryoLetters. – 2004. – Vol. 25, №4. – P. 154–167.
12. Lee H., Huang G., Chiang H. et al. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis // Stem Cells. – 2003. – Vol. 21, №2. – P. 190–199.
13. Liu B.L., McGrath J., McCabe L. et al. Response of murine osteoblasts and porous hydroxyapatite scaffolds to two-step, slow freezing and vitrification processes // Cell Preservation Technology. – 2002. – Vol. 1, №1. – P. 33–44.
14. Malpique R., Ehrhart F., Katsen-Globa F. et al. Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing // Tissue Engineering. – 2009. – Vol. 3, №14. – P. 150–165.
15. Mukherjee N., Chen Z., Sambanis A. et al. Effects of cryopreservation on cell viability and insulin secretion in a model tissue-engineered pancreatic substitute (TEPS) // Cell Transplant. – 2005. – Vol. 14, № 7. – P. 449–456.
16. Murua A., Portero A., Orive G., et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application // J. Control. Rel. – 2008. – Vol. 132, №4. – P. 76–83.
17. Pichugin Y., Fahy G.M., Morin R. Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification // Cryobiology. – 2006. – Vol. 52, №3. – P. 228–239.
18. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – Vol. 284, №5411. – P. 143–147.
19. Reubinoff B.E., Pera M.E., Vajta G. et al. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method // Hum. Reprod. – 2001. – Vol.16, №10. – P. 2187–2194.
20. Tao L., Canquan Z., Caixia L., et al. Bulk vitrification of human embryonic stem cells // Human Reproduction. – 2008 – Vol. 23, №2. – P. 358–364.
21. Zimmermann H., Shirley S. G., Zimmerman U. Alginate-based encapsulation of cells: past, present and future // Cur. Diabetes Rep. – 2007. – Vol. 7, №4. – P. 314–320.
3. Petrenko A.Yu., Petrenko Yu.A., Mazur S.P. et al. Isolation and multilinear differentiation of stromal cells from fetal and adult human tissues // Transplantologiya. – 2007. – Vol. 9, N1. – P. 218–220.
4. Pravdyuk A.I., Petrenko Yu.A., Volkova N.A., Petrenko A.Yu. Properties of human mesenchymal stromal cells at encapsulation in alginate microspheres // Biotechnology. – 2010. – Vol. 3, N2. – P. 62–70.
5. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // Blood. – 2005. – Vol. 105, N4. – P. 1815–1822.
6. Cai X.Y., Chen G.A., Lian Y. et al. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20, N7. – P. 1969–1974.
7. de Graaf I., Draaisma A., Schoeman O. et al. Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification // Cryobiology. – 2007. – Vol. 54, N1. – P. 1–12.
8. Fahy G.M. Vitrification. Emerging applications and engineering contributions. // Low temperature biotechnology. – 1988. – Vol. 10, N6 – P. 113–146.
9. Fahy G.M., Wowk B., Wu J. et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48, N2. – P. 78–157.
10. Gajadhar B., Kong L., Raquel M. et al. Cryopreservation of alginate-fibrin beads involving bone marrow derived mesenchymal stromal cells by vitrification // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30, N2 – P. 336–343.
11. Kuleshova L., Wang W., Wu Y. et al. Vitrification of encapsulated hepatocytes with reduced cooling and warming rates // CryoLetters. – 2004. – Vol. 25, N4. – P. 154–167.
12. Lee H., Huang G., Chiang H. et al. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis // Stem Cells. – 2003. – Vol. 21, N2. – P. 190–199.
13. Liu B.L., McGrath J., McCabe L. et al. Response of murine osteoblasts and porous hydroxyapatite scaffolds to two-step, slow freezing and vitrification processes // Cell Preservation Technology. – 2002. – Vol. 1, N1. – P. 33–44.
14. Malpique R., Ehrhart F., Katsen-Globa F. et al. Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing // Tissue Engineering. – 2009. – Vol. 3, N14. – P. 150–165.
15. Mukherjee N., Chen Z., Sambanis A. et al. Effects of cryopreservation on cell viability and insulin secretion in a model tissue-engineered pancreatic substitute (TEPS) // Cell Transplant. – 2005. – Vol. 14, N7. – P. 449–456.
16. Murua A., Portero A., Orive G., et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application // J. Control. Rel. – 2008. – Vol. 132, N4. – P. 76 – 83.
17. Pichugin Y., Fahy G.M., Morin R. Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification // Cryobiology. – 2006. – Vol. 52, N3. – P. 228–239.
18. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – Vol. 284, N5411. – P. 143–147.
19. Reubinoff B.E., Pera M.E., Vajta G. et al. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method // Hum. Reprod. – 2001. – Vol.16, N10. – P. 2187–2194.
20. Tao L., Canquan Z., Caixia L., et al. Bulk vitrification of human embryonic stem cells // Human Reproduction. – 2008 – Vol. 23, N2. – P. 358–364.
21. Zimmermann H., Shirley S. G., Zimmerman U. Alginate-based encapsulation of cells: past, present and future // Cur. Diabetes Rep. – 2007. – Vol. 7, N4. – P. 314–320.

Поступила 21.02.1012

Accepted 21.02.1012