

Національна академія наук України
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Тарусін Дмитро Миколайович

УДК 611.013.395:57.086.13:615.014.41:544.77.022.542

ДИСЕРТАЦІЯ

Гіпотермічне зберігання та кріоконсервування мезенхімальних стромальних клітин у складі альгінатних мікросфер

03.00.19 – кріобіологія

091 - біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____Д.М. Тарусін

Науковий керівник Петренко Олександр Юрійович
доктор біологічних наук, професор

Харків - 2018

АНОТАЦІЯ

Тарусін Д.М. Гіпотермічне зберігання та кріоконсервування мезенхімальних стромальних клітин у складі альгінатних мікросфер. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 «кріобіологія» (091 - біологія). – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2018.

Дисертаційна робота присвячена визначенню впливу інкапсуляції у альгінатні мікросфери (АМС) шляхом електророзпилення на загальнобіологічні та специфічні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) дерми людини, а також їх чутливості до кріоконсервування та зберігання за позитивних температур.

Описано систему для отримання АМС, що включала шприцевий інфузійний насос, шприц для гелеутворювача об'ємом 1 мл з тупокінцевою голкою діаметром 0,33 мм, ємність для гелюючого розчину і генератор з функцією регульованої подачі напруги від 0 до 7 кВ. Встановлено, що при вільному падінні крапель альгінату у гелюючий розчин CaCl_2 формувалися мікросфери діаметром близько 2000 мкм. Подання навіть незначної напруги зменшувало розмір АМС до 1500 мкм, подальше зменшення діаметра крапель корелювало зі збільшенням напруги.

Значущими для процесу отримання мікросфер певного розміру та форми були такі параметри системи як відстань між місцем формування крапель (голкою) та гелюючим розчином, швидкість вивільнення гелеутворювача, форма кінчика голки. Основним параметром, який визначав форму одержуваних АМС, була концентрація розчинів альгінату натрію і хлористого кальцію. Найбільш стабільні мікросфери правильної сферичної форми з гладкою поверхнею утворювалися при використанні 2,0 %-го альгінату натрію за умови його полімеризації у 2,0 %-му розчині CaCl_2 .

Визначені параметри роботи системи, а саме: подана напруга ≈ 7 кВ, відстань від кінчика голки до поверхні гелюючого розчину 4 см, швидкість

вивільнення альгінату зі шприца 10 мл/год, тупокінцева форма голки, концентрація розчину альгінату натрію 2,0 %; концентрація CaCl_2 2,0 % – забезпечили отримання АМС фіксованого діаметру в діапазоні від 200 до 800 мкм з відхиленням в межах 7 %.

При отриманні АМС із вміщеними МСК останні по закінченню полімеризації візуалізувалися у товщі прозорого гідрогелю як одиночні відокремлені одна від одної клітини, розташовані рівномірно по всьому об'єму АМС. За МТТ-тестом життєздатність МСК у складі АМС становила 94 ± 3 % при вихідній життєздатності клітин до інкапсуляції 96 ± 2 %. Культивування МСК у складі АМС протягом 7 діб не призводило до зміни їхньої морфології та достовірного зниження життєздатності. Це дозволило зробити висновок, що визначені у даній роботі умови отримання мікросфер із застосуванням електророзпилення не чинять негативного впливу на клітини в перебігу самої процедури інкапсуляції.

Ідентифікаційними характеристиками МСК, що були визначені для моношарової культури цих клітин, є фібробластоподібна морфологія, адгезивність, специфічний імунофенотип та наявність проліферативного і диференціовального потенціалів. Дослідження з об'ємними макропористими носіями, біосумісними з МСК, такими, наприклад, як обрані нами модифіковані скелети морської губки *Ianthella basta*, показали, що специфічні властивості МСК реалізуються і в умовах тривимірного культивування. Однак МСК, що проходили об'ємне культивування в товщі гідрогеля АМС, отриманих з 2 %-го альгінату натрію, не розпластувалися і не проліферували.

Порівняльне дослідження виявило, що метаболічна активність МСК у складі АМС майже на 30 % нижча за рівень метаболічної активності клітин у моношарі: рівні утворення формазану з МТТ і відновлення AlamarBlue становили для МСК у складі АМС $0,44 \pm 0,01$ умовних одиниць абсорбції (УОА) та $2530,6 \pm 151,7$ умовних одиниць флуоресценції (УОФ) відповідно, тоді як моношарові культури МСК характеризувалися показниками $0,64 \pm 0,02$ УОА та 3531 ± 96 УОФ.

За допомогою катіонного карбоціанінового барвника JC-1 були виявлені відмінності у мембранному потенціалі мітохондрій МСК в залежності від умов їх перебування. МСК в моношарі демонстрували більш виражену флуоресценцію у червоно-помаранчевій області, що притаманна клітинам з високим $\Delta\psi_m$. У складі АМС, навпаки, більшість клітин мали зелену флуоресценцію, тобто характеризувалися низьким $\Delta\psi_m$. Кількісна оцінка спектрофлуориметричним методом підтвердила мікроскопічні спостереження: для МСК у складі АМС були характерними високі показники відносних одиниць флуоресценції (ВОФ) у зеленій області – $0,566 \pm 0,051$, у той час як інтенсивність флуоресценції у червоно-помаранчевої області складала лише $0,277 \pm 0,067$ ВОФ. Для МСК у вигляді моношару, навпаки, в зеленій області показники флуоресценції мали нижчий рівень, ніж у червоно-помаранчевій: $0,387 \pm 0,019$ та $0,564 \pm 0,020$ ВОФ, відповідно.

Таким чином, інкапсульовані в АМС МСК характеризувалися зниженням загальної метаболічної активності та мембранного потенціалу мітохондрій, а також відсутністю адгезивної та проліферативної активностей, які є достатньо енерговитратними процесами.

Означені відмінності мали оборотний характер: після вивільнення з АМС і переведення в умови моношарового культивування 85 ± 4 % клітин прикріплювалися до адгезивної поверхні і були здатні до проліферації. На третю добу культивування на культуральному пластику клітини формували суцільний рівномірний моношар, а показник АВ-теста зростав втричі: 5766 ± 122 УОФ порівняно з 1532 ± 160 УОФ на першу добу.

Вивільнені з АМС МСК виявляли здатність до індукованого диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямках, що підтверджувалося накопиченням відповідних продуктів диференціювання в моношарових культурах. Істотних відмінностей між контрольними культурами та клітинами, що були піддані інкапсуляції в АМС, при цьому виявлено не було.

Таким чином, проведені дослідження показали, що визначена процедура отримання АМС, що містять МСК, за допомогою електророзпилення не чинить негативного впливу на ідентифікаційні характеристики МСК, а блокування

проліферації і зниження метаболічної активності клітин у складі АМС мають оборотний характер і є обмеженням реалізації потенціалу МСК, а не втратою клітинами відповідних властивостей.

Раніше в нашій лабораторії було показано, що високу збереженість МСК, інкапсульованих в АМС, може забезпечити програмне повільне двоетапне заморожування у присутності ДМСО за умов залучення ініціації кристалоутворення та використання в кріозахисному розчині не менше 10 % ДМСО. Відмінність за розміром та технологією отримання АМС, застосованих у попередніх дослідженнях, зумовила необхідність проведення подальших досліджень щодо кріоконсервування АМС з МСК. При цьому нами була здійснена спроба залучити попереднє теоретичне обґрунтування і математичний розрахунок до вибору найбільш ефективного режиму заморожування для даного конкретного об'єкта. Крім того, ми намагалися отримати високі показники збереженості клітин за меншої концентрації кріопротектора.

Визначення динаміки змін об'єму МСК при експозиції їх в 1 М ДМСО показало, що осмотична реакція МСК на таку концентрацію кріопротектора (швидка дегідратація та подальша повільна регідратація) як в суспензії, так і в АМС повністю завершувалася до 5-ї хвилини експозиції і не супроводжувалася помітними порушеннями клітинної цілісності, однак дегідратація МСК у складі АМС відбувалася повільніше. Експериментально визначений відносний об'єм МСК у різні моменти перебування клітин в 1 М розчині ДМСО, а також отримані на їхній основі теоретичні криві залежності зміни клітинного об'єму від тривалості контакту з кріопротектором. Розрахунок з використанням фізико-математичної моделі показав, що теоретична крива коректно описує експериментальні дані для МСК у вигляді суспензії за коефіцієнтів проникності мембран для молекул води $L_p = (3,38 \pm 1,1) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$ і ДМСО $K_1 = (1,60 \pm 0,21) \times 10^{-8} \text{ м/с}$, а для МСК у складі АМС – за $L_p = (2,03 \pm 1,4) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$ і $K_1 = (1,07 \pm 0,18) \times 10^{-8} \text{ м/с}$. Означені відмінності цих характеристик для інкапсульованих клітин, ймовірно, є наслідком уповільнення дифузії кріопротектора у товщу альгінатного гідрогелю, і, отже, поступового зростання

концентрації кріопротектора безпосередньо біля самих клітин, а також розведення за рахунок утримуваної всередині АМС води.

Підставляючи отримані коефіцієнти проникності до фізико-математичної моделі, що описує кінетику змін відносного об'єму клітин у процесі позаклітинної кристалізації за певної швидкості охолодження, вдалося спрогнозувати ступінь зневоднення МСК.

Прогнозоване зневоднення МСК, які заморожували зі швидкостями від 0,5 до 20 °С/хв до -40 °С, відрізняється для клітин у суспензії та у складі АМС: за швидкості охолодження 0,5 °С/хв розрахований відносний об'єм МСК у суспензії дорівнював 0,49, а у складі АМС - 0,57; за швидкості 1 °С/хв - 0,62 та 0,74, відповідно. Слід зазначити, що більші швидкості охолодження (від 10 °С/хв) не забезпечують достатнього зневоднення клітин, це може в результаті призвести до внутрішньоклітинної кристалізації і загибелі клітин у процесі заморожування.

Проведені експерименти по кріоконсервуванню суспензій МСК та АМС з МСК у кріозахисному середовищі з 1 М ДМСО показали достовірність зроблених висновків. Кріоконсервування, що включало охолодження зі швидкостями 10 та 20 °С/хв, призводило до загибелі близько 80 % клітин як у складі суспензії, так і у складі АМС. Кріоконсервування з використанням низьких швидкостей охолодження (0,5 та 1 °С/хв) не порушувало цілісність АМС, а життєздатність клітин зберігалася на рівні 75 % і вище. Найвищі значення життєздатності були отримані за швидкості охолодження 1 °С/хв: 88±4 % для суспензій клітин та 81±4 % для клітин у складі АМС. Однакові значення життєздатності МСК, кріоконсервованих у вигляді суспензії і у складі АМС, були отримані при зниженні швидкості охолодження до 0,5 °С/хв.

З метою оцінки можливості застосування технології інкапсуляції для короткострокового зберігання та транспортування клітин було проведено порівняльне вивчення структурно-функціонального стану та здатності до індукованого диференціювання МСК, що перебували за позитивних температур (4, 22, 37 °С) у вигляді суспензії або у складі АМС.

Зберігання суспензій МСК в КС за усіх обраних температур супроводжувалося поступовим зниженням їхньої життєздатності, починаючи вже з 1-ї доби, що мало наслідком значну втрату життєздатних клітин наприкінці спостереження, на 3-ю добу. Найбільш вираженим зниження життєздатності було в разі зберігання при 4 °С – до 30 %. Інкапсульовані в АМС МСК краще переживали короткострокове зберігання, достовірні відмінності після 1-ї доби зберігання і надалі, впродовж усього періоду спостереження, були відзначені тільки у разі зберігання за 4 °С. За температури 22 °С достовірне зниження показника відзначалося лише на кінець експерименту, а зберігання інкапсульованих МСК при 37 °С не призводило до зниження життєздатності впродовж 3-х діб ($87\pm 9\%$).

Подібні зміни спостерігалися при визначенні здатності клітин до адгезії: в перебігу зберігання суспензій МСК відбувалося поступове зниження їхньої здатності адгезувати до підложки; МСК, які проходили етап зберігання за 22 та 37 °С у складі АМС, значно більшою мірою зберігали свої адгезивні властивості, ніж клітини в суспензії; переваг інкапсульованих клітин над клітинами у суспензії в разі гіпотермічного зберігання за 4 °С не виявлялося.

Аналіз метаболічної активності культур МСК, що були отримані після зберігання за позитивних температур у КС, виявив, що тільки культури МСК, що зберігалися у складі АМС за 22 і 37 °С, мали показники АВ-тесту на рівні контролю $4,04\pm 0,56 - 4,24\pm 0,52$ ВОФ незалежно від терміну зберігання.

Дослідження диференціювальних властивостей показало, що МСК після перебування у складі АМС у КС за різних позитивних температур зберігають здатність до остео- та адипогенезу.

Таким чином, інкапсуляція у АМС дозволяє подовжити терміни безпечного зберігання МСК у КС за позитивних температур 22 і 37 °С: перебуваючи у складі АМС, клітини більшою мірою зберігають життєздатність, здатність прикріплюватися до культурального пластику, метаболічну активність за АВ-тестом та диференціювальний потенціал, ніж за зберігання у вигляді суспензії.

Виявлене погіршення показників життєздатності та метаболічної активності МСК під час зберігання в КС при 4 °С може бути обумовлене складом обраного середовища, яке призначене забезпечувати підтримку клітинами при нормотермії свого гомеостазу шляхом реалізації власних метаболічних процесів, які при гіпотермії зазнають значних змін. Для перевірки цього припущення були проведені експерименти, в яких МСК в суспензії або у складі АМС зберігали в спеціалізованих розчинах – ССР та UW.

Гіпотермічне зберігання за 4 °С суспензії МСК у КС призводило до зниження їхньої життєздатності до 33 ± 10 % вже на 3-ю добу. Інкапсуляція у АМС частково запобігала загибелі клітин, і життєздатність становила 51 ± 9 %. Застосування розчинів ССР і UW дозволяло зберегти життєздатність на цей строк практично на контрольному рівні. Подовження терміну зберігання в КС до 7-и діб призводило до загибелі майже усіх МСК як у суспензії, так і у складі АМС. В разі використання розчинів ССР та UW життєздатність МСК як у вигляді суспензії, так і у складі АМС достовірно знижувалася, проте залишалася на досить високому рівні (від 56 ± 9 % до 76 ± 6 % для різних груп спостереження).

Гіпотермічне зберігання у КС призводило до значних втрат здатності МСК до адгезії. Залучення спеціалізованих розчинів істотно уповільнювало цей процес, дозволяючи зберегти даний показник на рівні не нижчому за 50 % на 7-му добу експерименту, причому відмінностей у досліджуваних властивостях між клітинами в суспензії та клітинами в АМС виявлено не було.

Метаболічна активність за АВ-тестом МСК, що пройшли етап гіпотермічного зберігання в КС, була істотно нижчою за контрольний рівень на обидва строки спостереження. Застосування розчинів ССР та UW значною мірою запобігало втраті метаболічної активності: після 7-ми діб зберігання показники АВ-теста зменшувалися лише на 40-30 % від рівня контролю. Різниця між показниками для клітин всуспензії і у складі АМС була відсутня.

МСК, що пройшли етап гіпотермічного зберігання у розчинах ССР та UW у складі АМС, мали здатність до індукованого диференціювання у остеогенному та адипогенному напрямках.

Таким чином, МСК у складі АМС після гіпотермічного зберігання впродовж 7-х діб у середовищах ССР та UW залишаються морфологічно, метаболічно та функціонально повноцінними. При поверненні клітин в умови моношарового культивування вони прикріплюються, набувають фібробластоподібного вигляду, активно проліферують та виявляють здатність до індукованого диференціювання у адипо- та остеогенному напрямках.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, альгінатні мікросфери, електророзпилення, кріоконсервування, гіпотермічне зберігання, метаболічна активність, мембранний потенціал мітохондрій, адгезія, проліферація, диференціювальний потенціал.

ABSTRACT

Tarusin D.M. Hypothermic storage and cryopreservation of mesenchymal stromal cells in alginate microspheres. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the PhD degree in the specialty 03.00.19 “cryobiology” (091 - biology). – Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv, 2018.

The dissertation is devoted to the determination of the influence of encapsulation in alginate microsphere (AMS) by electrospraying on the general biological and specific properties of human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs), as well as their sensitivity to cryopreservation and storage at positive temperatures.

A system for receiving AMS including a syringe infusion pump, a syringe for a gel with a volume of 1 ml and with a needle diameter of 0.33 mm, a bath for a gelling solution, and a generator with a controlled supply voltage of 0 to 7 kV is described. It was established that at free fall of alginate droplets in the gelling solution of CaCl₂ resulted in forming of microspheres with a diameter of about 2000 μm. The applying of even insignificant voltages reduced the size of the AMS to 1500 μm, further reducing the diameter of the droplets correlated with increasing voltage.

Significant for the process of obtaining AMS with a certain size and shape were the system parameters such as the distance between the place of droplet formation (needle) and the gelling solution, the release rate of the gel, the shape of the needle tip. The main parameter that determined the shape of the AMS was the concentration of solutions of sodium alginate and calcium chloride. The most stable microspheres of a correct spherical shape with a smooth surface were formed using 2.0 % sodium alginate, when polymerized in a 2.0 % solution of CaCl₂.

The parameters of the system are determined, namely: the applied voltage ≈ 7 kV, the distance from the tip of the needle to the surface of the gelling solution 4 cm, the rate of release of alginate from the syringe 10 ml/h, the blunt form of the needle, the

concentration of sodium alginate solution 2.0 %; concentration of CaCl_2 2.0 % - ensured receipt of AMS fixed diameter in the range from 200 to 800 μm with a deviation of 7 %.

Upon receipt of the AMS with the MSCs, the last after the completion of the polymerization were visualized in a layer of transparent hydrogel as single separated cells, located evenly throughout the volume of AMS. According to the MTT-test, the viability of MSCs in the AMS was 94 ± 3 % with initial cell viability 96 ± 2 % before encapsulation. Cultivation of MSCs in the AMS for 7 days did not change their morphology and a significant decrease in viability. This made it possible to conclude that the conditions for obtaining microspheres with the use of electric spin in the given work do not have a negative effect on cells during the course of the encapsulation procedure itself.

Identification characteristics of MSCs that were determined for monolayer culture of these cells are fibroblast-like morphology, adhesion, specific immunophenotype, and the presence of proliferative and differentiating potentials. Studies with volumetric macroporous carriers that are biocompatible with MSCs, such as the modified sea sponge *Ianthella basta* skeletons, have shown that the specific properties of MSCs are also realized under three-dimensional cultivation. However, MSCs undergoing 3D cultivation in the thickness of the hydrogel AMS, obtained from 2 % sodium alginate, were not spread or proliferated.

A comparative study showed that the metabolic activity of MSCs in the AMS was almost 30 % lower than the level of metabolic activity of the cells in the monolayer: the levels of formazan formation from MTT and the recovery rate of AlamarBlue for MSCs in the AMS is 0.44 ± 0.01 relative absorption unites (RAU) and 2530.6 ± 151.7 relative fluorescence units (RFU) respectively, while monolayer cultures of MSCs were characterized by 0.64 ± 0.02 RAU and 3531 ± 96 RFU.

Using the cationic carbocyanine dye JC-1, differences in the membrane potential of mitochondria MSCs were detected, depending on the conditions of their stay. MSCs in a monolayer exhibited more pronounced fluorescence in the red-orange region, which is inherent in cells with high $\Delta\psi_m$. In the AMS, on the contrary, most cells had green fluorescence, that is, they were characterized by low $\Delta\psi_m$. Quantitative evaluation by

the spectrofluorimetric method confirmed the microscopic observation: for the MSCs in AMS, high values of RFU in the green area were characteristic of 0.566 ± 0.051 , whereas the fluorescence intensity in the red-orange region was only 0.277 ± 0.067 RFU. For MSCs in the form of a monolayer, on the contrary, in the green area fluorescence indices had a lower level than in the red-orange: 0.37 ± 0.019 and 0.564 ± 0.020 RFU, respectively.

Thus, encapsulated in AMS MSCs were characterized by a decrease in total metabolic activity and membrane potential of mitochondria, as well as the absence of adhesive and proliferative activity, which are sufficiently energy-consuming processes.

The indicated differences were reversible: after release from the AMS and transfer to the conditions of monolayer cultivation, 85 ± 4 % of the cells were attached to the adhesive surface and were capable of proliferation. On the third day of cultivation on a culture plastic the cells formed a continuous uniform monolayer, and the index of the AlamarBlue-test increased threefold: 5766 ± 122 RFU compared with 1532 ± 160 RFU at the first day.

Released from AMS MSCs showed the ability to induced differentiation in the adipogenic and osteogenic directions, which was confirmed by the accumulation of the corresponding differentiation products in monolayer cultures. Significant differences between control cultures and cells that were subjected to encapsulation in the AMS, however, were not detected.

Thus, the conducted studies have shown that the specified procedure for obtaining AMS containing MSCs by means of electrospraying does not have a negative effect on the identification characteristics of MSCs, and blockage of proliferation and decrease in metabolic activity of cells in the AMS are reversible and are a limitation to the realization of the potential of MSCs, but not the loss of cells corresponding properties.

Previously, in our laboratory it was shown that the high conservation outcome of MSCs encapsulated in AMS could provide slow two-stage freezing in the presence of DMSO with initiation of crystalline formation and use in the cryoprotective solution of at least 10 % DMSO. The difference in the size and technology of obtaining AMS used in previous studies has led to the need for further research on cryopreservation of AMS

with MSCs. At the same time, we attempted to involve the previous theoretical substantiation and mathematical calculation before choosing the most effective freezing regime for a particular object. In addition, we have been trying to obtain high levels of cell preservation at a lower concentration of cryoprotectant.

Determination of the dynamics of changes in the volume of MSCs when exposed to 1 M DMSO showed that the osmotic response of MSCs to such a concentration of cryoprotectant (rapid dehydration and subsequent slow rehydration) both in the suspension and in the AMS completed in the 5-minute exposure and not was accompanied by marked violations of cellular integrity, but dehydration of MSCs in the AMS occurred more slowly. The experimental determination of the relative volume of MSCs at different moments of the period of cell stay in a 1 M DMSO solution, as well as theoretical curves of the dependence of cell volume changes on the duration of contact with the cryoprotectant were obtained on their basis. The calculation using the physical-mathematical model showed that the theoretical curve correctly describes the experimental data for MSCs in the form of a suspension with the coefficients of permeability of membranes for water molecules $L_p = (3,38 \pm 1,1) \times 10^{-14} \text{ m}^3/\text{N} \cdot \text{s}$ and DMSO $K_1 = (1,60 \pm 0,21) \times 10^{-8} \text{ m/s}$, and for MSCs in the AMS for $L_p = (2,03 \pm 1,4) \times 10^{-14} \text{ m}^3/\text{N} \cdot \text{s}$ and $K_1 = (1,07 \pm 0,18) \times 10^{-8} \text{ m/s}$. The marked differences in these characteristics for encapsulated cells are probably due to the delayed diffusion of cryoprotectants into the thickness of the alginate hydrogel, and, consequently, the gradual increase in the concentration of cryoprotectant directly at the cells itself, as well as the dilution at the expense of the water retained inside the AMS.

Substituting obtained coefficients of permeability to a physico-mathematical model describing the kinetics of changes in the relative volume of cells in the process of extracellular crystallization at a certain cooling rate, allowed to predict the degree of dehydration of MSCs.

Forecast dehydration of MSCs that have been frozen at a rate of from 0.5 to 20 °C/min to -40 °C is different for cells in the suspension and in the AMS: at a cooling rate of 0.5 °C/min, the relative volume of MSCs is calculated in the suspension was 0.49, and in AMC - 0.57; at a speed of 1 °C/min - 0.62 and 0.74, respectively. It should

be noted that higher cooling rates (from 10 °C/min) do not provide sufficient dehydration of the cells, as a result of which can lead to intracellular crystallization and cell death in the freezing process.

Experiments on cryopreservation of suspensions of MSCs and AMS with MSCs in cryoprotective medium with 1 M DMSO have shown the reliability of the conclusions. Cryopreservation, which included cooling at 10 and 20 °C/min, resulted in the death of about 80 % of the cells, both in the suspension and in the AMS. Cryopreservation using low cooling rates (0.5 and 1 °C/min) did not violate the integrity of the AMS, and cell viability remained at 75 % and above. The highest viability values were obtained at a cooling rate of 1 °C/min: 88±4 % for cell suspensions and 81±4 % for cells in the AMS. Same values of viability of MSCs, cryopreserved in the form of a suspension and in the AMS, were obtained with a decrease in the cooling rate to 0.5 °C/min.

In order to evaluate the possibility of using encapsulation technology for short-term storage and transport of cells, a comparative study of the structural-functional state and the ability to induced differentiation of MSCs at favorable temperatures (4, 22, 37 °C) in the form of suspension or AMC was performed.

Storage of MSC suspensions in the culture medium (CM) at all selected temperatures was accompanied by a gradual decrease in their viability, starting from the 1st day, which resulted in a significant loss of viable cells at the end of observation, on the 3rd day. The most pronounced decrease in viability was in the case of storage at 4 °C - up to 30 %. Encapsulated in AMS MSCs were better exposed to short-term storage, reliable differences after 1 day of storage and further, throughout the observation period, were noted only if stored at 4 °C. At 22 °C, a significant decrease in the index was observed only at the end of the experiment, and storage of encapsulated MSCs at 37 °C did not lead to a decrease in viability within 3 days (87±9 %).

Similar changes were observed in determining the cell's ability to adhesion: during the storage of suspensions, MSCs gradually decreased their ability to adhere to the substrate; MSCs, which passed the storage stage at 22 and 37 °C in the AMS, retained their adhesive properties much more than cells in the suspension; the

advantages of encapsulated cells over cells in the suspension in the case of hypothermic storage at 4 °C was not detected.

Analysis of the metabolic activity of cultures of MSCs obtained after storage at positive temperatures in the CM showed that only MSCs cultures stored in the AMS at 22 and 37 °C had an AR-assay at the control level of $4,04 \pm 0,56$ - 4.24 ± 0.52 RFU regardless of storage period.

Investigation of differentiation properties showed that MSCs after being in the AMS in the CM at different favorable temperatures retain the ability to osteo-adipogenesis.

Thus, encapsulation in the AMS allows for an extension of the time for safe storage of MSCs in the CM at positive temperatures of 22 and 37 °C: while in the AMS, cells remain more viable, able to attach to culture plastics, metabolic activity by the AB test and differentiation potential, than for storage in the form of a suspension.

The detected deterioration in the viability and metabolic activity of MSCs during storage in the CM at 4 °C may be due to the composition of the selected medium, which is designed to provide support for cells in the normalization of their homeostasis by implementing their own metabolic processes, which undergo significant changes in hypothermia. To test this assumption, experiments were conducted in which MSCs in a suspension or in the AMS was stored in specialized solutions - SBS and UW.

Hypothermic storage at 4 °C of the suspension of MSC in the CM led to a decrease in their viability to 33 ± 10 % already in the 3rd day. Encapsulation in AMS partially prevented cell death, and viability was 51 ± 9 %. Application of solutions of the SBS and UW allowed to maintain viability for this term almost at the control level. Extension of the shelf life in the CM to 7 days resulted in the death of almost all MSCs both in the suspension and in the AMS. In the case of the use of SBS and UW solutions, the viability of MSCs in the form of a suspension and in the AMS decreased significantly but remained at a rather high level (from 56 ± 9 % to 76 ± 6 % for different observation groups).

Hypothermal storage in the CM led to significant loss of the ability of MSCs to adhesion. Involvement of specialized solutions greatly slowed down this process,

allowing to maintain this index at a level not lower than 50 % on the 7th day of the experiment, with the differences in the properties studied between cells in suspension and cells in the AMS was not detected.

The metabolic activity of the AB-test of MSCs, which was the stage of hypothermic storage in the CM, was significantly lower than the control level for both periods of observation. The use of SBS and UW solutions greatly prevented the loss of metabolic activity: after 7 days of storage, the AB test decreased only by 40-30 % of the control level. There was no difference between the indicators for suspension cells and AMS.

MSCs that passed the stage of hypothermic storage in the solutions of SBS and UW in the AMS, had the ability to induce differentiation in the osteogenic and adipogenic directions.

Thus, the MSCs in the AMS after morphological, metabolic and functional complements during hypothermic storage for 7 days in the SBS and UW media. When the cells are returned to the conditions of monolayer cultivation, they are attached, become fibroblast-like, actively proliferate and exhibit the ability to induce differentiation in the adipose and osteogenic directions.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, alginate microspheres, electrospraying, cryopreservation, hypothermic storage, metabolic activity, membrane potential of mitochondria, adhesion, proliferation, differentiation potential.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. Тарусин Д. Н. Эффективность сахарозо-содержащего раствора и раствора UW для гипотермического хранения мезенхимальных стромальных клеток человека в суспензии или в составе альгинатных микросфер / Д. Н. Тарусин, Ю. А. Петренко, О. А. Семенченко, В. В. Муценко, В. С. Зайков, А. Ю. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 329–339. (Scopus).
2. Тарусин Д. Н. Выбор условий криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток в суспензии и альгинатных микросферах на основе изучения их осмотических реакций в растворе 1 М ДМСО / Д. Н. Тарусин, В. А. Киреев, С. Е. Коваленко, И. Ф. Коваленко, Л. Ф. Розанов, А. Ю. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №2. – С. 133–144. (Scopus).
3. Зайков В. С. Влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы на жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток после экспозиции с проникающими криопротекторами // В. С. Зайков, Д. Н. Тарусин, А. Ю. Петренко / Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 213–220. (Scopus).
4. Tarusin D. Encapsulation of mesenchymal stromal cells in alginate microspheres / D. Tarusin, S. Mazur, N. Volkova, Yu. Petrenko, V. Zaikov, A. Petrenko // Biotech Acta. – 2016. – V. 9, №4. – С. 58–66.
5. Mutsenko V. Novel chitin scaffolds derived from marine sponge *Ianthella basta* for tissue engineering approaches based on human mesenchymal stromal cells: Biocompatibility and cryopreservation / Gryshkov O., Lauterboeck L., Rogulska O., Tarusin D., Bazhenov V., Schütz K., Brüggemeier S., Gossila E., Akkineni A., Meißner H., Lode A., Meshke S., Fromont J., Stelling A., Tabachnik K., Gelinsky M., Nikulin S., Rodin S., Tonevitsky A., Petrenko A., Glasmacher B., Schupp P., Ehrlich H. // Int J Biol Macromol. – 2017. – 104(Pt B). – P. 1955–1965. (Scopus).

Патенти України

6. Пат. 95902 Україна, МПК А01N 1/02. Спосіб зберігання та транспортування клітин / Д. М. Тарусін, В. В. Муценко, В. С. Зайков, О. Ю. Петренко, Ю. О. Петренко ; власник ІПКіК НАН України. - № u201408225 ; заявл. 21.07.2014 ; опублік. 12.01.2015, Бюл. № 1.

7. Пат. 106836 Україна, МПК А61М 1/00. Пристрій для інкапсуляції біоматеріалів / Д. М. Тарусін, В. С. Зайков, О. Ю. Петренко ; власник ІПКіК НАН України. - № u201510854 ; заявл. 06.11.2015 ; опублік. 10.05.2016, Бюл. № 9.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

8. Тарусин Д. Н. Устойчивость мезенхимальных стромальных клеток, инкапсулированных в альгинатные микросферы, к краткосрочному хранению при положительных температурах / Д. Н. Тарусин, В. С. Зайков, В. В. Муценко, Ю. А. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. — 2014. — Т. 24, № 2. — С. 183. — рос., англ.

9. Тарусин Д. Н. Инкапсуляция в альгинатные микросферы – перспективный подход для транспортировки и краткосрочного хранения клеток / Д. Н. Тарусин, В. С. Зайков, В. В. Муценко, Ю. А. Петренко, А. Ю. Петренко // Ukr. Biochem. J. — 2014. — V. 86, № 5. — С. 221. — (Suppl. 2).

10. Petrenko A. Yu. Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells in Suspension and in Alginate Microspheres / A. Yu. Petrenko, V. S. Zaikov, A. I. Pravduk, N. A. Trufanova, D. N. Tarusin, Yu. A. Petrenko // Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM in London, UK. October 2014. P. 26.

11. Petrenko A. Low temperature preservation of mesenchymal stromal cells seeded in various scaffolds for tissue equivalent development / A. Petrenko, V. S. Zaikov, V. V. Muzenko, D. N. Tarusin, H. Erlich // J Cell Sci Ther. — 2015. — V.6, № 2. — P. 118.

12. Тарусин Д. Н. Влияние гипотермического хранения в различных средах на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер / Д. Н. Тарусин, В. С. Зайков, В. В.

Муценко, Ю. А. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. — 2015. — Т.25, №2. — С. 183.

13. Tarusin D. N. Encapsulation in alginate microspheres reduces mesenchymal stromal cell death during storage / D. N. Tarusin, V. S. Zajkov, Y. A. Petrenko, A. Y. Petrenko // Cryobiology. — 2015. — V.71, № 3. — P. 561.

14. Tarusin D. Encapsulation in alginate microspheres enhances viability of mesenchymal stromal cells for efficient transport/short-term storage // Conference for Young Scientists (CYS-2015) in Kiev, Ukraine. September 2015. P. 43.

15. Petrenko A. Proliferation and differentiation potential of human adult mesenchymal stromal cells in three-dimensional culture. The effect of storage at cryogenic and ambient temperatures / A. Petrenko, V. Muzenko, E. Rogulska, V. Zaikov, S. Mazur, D. Tarusin, H. Erlich, Y. Petrenko // International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology in Lviv, Ukraine. October 2015. P.15.

16. Tarusin D. N. Cause of Encapsulated Mesenchymal Stromal Cells Tolerance to Short-Term Storage / D. N. Tarusin, V. V. Mutsenko, V. S. Zaikov // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. — 2016. — V.26, № 2. — P. 164.

ЗМІСТ

| | |
|---|-----------|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ | 23 |
| ВСТУП..... | 25 |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ | 31 |
| 1.1. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини | 31 |
| 1.2. Інкапсуляція клітин у альгінатні мікросфери..... | 33 |
| 1.3. Загальні принципи кріоконсервування та гіпотермічного зберігання клітин..... | 42 |
| 1.3.1. Кріоконсервування клітин..... | 42 |
| 1.3.2. Гіпотермічне зберігання клітин | 48 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ | 53 |
| 2.1. Виділення і моношарове культивування МСК | 53 |
| 2.2. Отримання АМС | 54 |
| 2.3. Інкапсуляція МСК у АМС | 54 |
| 2.4. Розчинення АМС..... | 55 |
| 2.5. Отримання і заселення тривимірних носіїв на основі скелета губки <i>Ianthella basta</i> | 55 |
| 2.6. Оцінка життєздатності клітин шляхом подвійного забарвлення ФДА і ЕБ..... | 56 |
| 2.7. Оцінка життєздатності та метаболічної активності МСК за МТТ тестом..... | 57 |
| 2.8. Оцінка метаболічної і проліферативної активностей МСК за Alamar Blue-тестом..... | 59 |
| 2.9. Оцінка здатності клітин прикріплюватися до культурального пластику | 60 |
| 2.10. Оцінка мембранного потенціалу мітохондрій МСК з використанням барвника JC-1 | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 2.11. Спрямоване остеогенне диференціювання МСК | 62 |
| 2.12. Спрямоване адіпогенне диференціювання МСК | 63 |
| 2.13. Оцінка осмотичної реакції МСК на 1 М розчин ДМСО | 63 |
| 2.14. Кріоконсервування МСК | 66 |
| 2.15. Зберігання МСК за позитивних температур | 67 |
| 2.16. Методи статистичної обробки даних..... | 69 |
| 2.17. Використані реактиви..... | 69 |
| РОЗДІЛ 3. ОТРИМАННЯ АЛЬГІНАТНИХ МІКРОСФЕР ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ЕЛЕКТРОРОЗПИЛЕННЯ ТА ВЛАСТИВОСТІ ІНКАПСУЛЬОВАНИХ В НИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН..... | 70 |
| 3.1. Отримання АМС із застосуванням електророзпилення..... | 70 |
| 3.1.1. Система для формування гідрогелевих мікросфер із застосуванням електророзпилення. | 70 |
| 3.1.2. Процедура отримання АМС | 73 |
| 3.2. Властивості МСК у складі АМС, отриманих із застосуванням електророзпилення | 78 |
| 3.2.1. Морфологія і життєздатність МСК у складі АМС..... | 78 |
| 3.2.2. Вплив інкапсуляції в АМС на метаболічний стан МСК | 80 |
| 3.2.3. Функціональна активність МСК після вивільнення з АМС | 86 |
| РОЗДІЛ 4. КРІОКОНСЕРВУВАННЯ МСК У СКЛАДІ АМС | 96 |
| 4.1. Визначення осмотичної поведінки МСК в розчині кріопротектора та при охолодженні з різними швидкостями..... | 97 |
| 4.2. Вплив швидкості охолодження на збереженість інкапсульованих МСК при кріоконсервуванні під захистом 1 М ДМСО | 101 |

| | |
|--|------------|
| РОЗДІЛ 5. ГІПОТЕРМІЧНЕ ТА НОРМОТЕРМІЧНЕ ЗБЕРІГАННЯ МСК У СКЛАДІ АМС ПРИ ПОЗИТИВНИХ ТЕМПЕРАТУРАХ | 108 |
| 5.1. Зберігання МСК у культуральному середовищі за 37, 22 і 4 °С | 108 |
| 5.2. Гіпотермічне зберігання МСК у спеціалізованих розчинах (ССР, UW) за 4 °С | 117 |
| УЗАГАЛЬНЕННЯ | 128 |
| ВИСНОВКИ | 137 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ | 139 |
| ДОДАТОК А | 173 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АМС - альгінатні мікросфери

ВОФ - відносні одиниці флуоресценції

ДМСО - диметилсульфоксид

ЕБ - етідіум бромід

ЕС - ембріональна теляча сироватка

K_1 – коефіцієнт проникності плазматичної мембрани клітини

КС – культуральне середовище

МСК - мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини

МТТ - 3- (4,5-діметілтіазол-2-іл) -2,5-діфенілтетразоліум бромід

С – концентрація речовини

Т – температура

УОА - умовні одиниці абсорбції

УОФ - умовні одиниці флуоресценції

ФДА – флуоресцеїн діацетат

АВ - індикатор Alamar Blue

JS-1 - 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетілбензimidазолкарбоцианін йодид

α -MEM – Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (мінімальне основне середовище Ігла у альфа модифікації)

α – об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин

γ – поверхнево-об'ємне відношення клітини

d – діаметр клітин

E_α – енергія активації процесу перенесення крізь плазматичну мембрану речовини

g – значення відношення сумарного об'єму клітин до повного об'єму системи.

L_p – коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани

S – площа поверхні клітини

V – об'єм клітини

β – швидкість охолодження

Δp – перепад гідростатичного тиску на клітинній мембрані

π^{in} – внутрішньоклітинний осмотичний тиск

π^{out} – осмотичний тиск зовнішнього середовища

σ_1 – коефіцієнт відбиття для проникаючої крізь клітинну мембрану речовини

τ – характерний час проникнення молекул води до клітини

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Інтенсивний розвиток біотехнології, регенеративної медицини, клітинної терапії та тканинної інженерії виводить на перший план як предмет медико-біологічних досліджень штучно створені тривимірні структури, що містять функціонально активні клітини. Це в свою чергу підвищує актуальність розробки сучасних методологічних та технологічних підходів до утворення, тривалого та короткострокового зберігання біоінженерних конструктів.

Один із провідних напрямків біоінженерних досліджень ґрунтується на використанні гідрогелевих мікросфер. Для отримання гідрогелевих мікросфер, що містять всередині життєздатні клітини, найбільш придатним матеріалом натеper можна вважати альгінат: він не чинить негативного впливу на клітини [1], його фізико-хімічні властивості є подібними до позаклітинного матриксу [2] і процес його гелеутворення здатний відбуватися за умов, наближених до фізіологічних. Для вміщених в альгінатні мікросфери (АМС) клітин гідрогель стає бар'єром по відношенню до молекул з масою понад 100 кДа, проте дозволяє дифундувати поживним речовинам та кисню [3].

Натеper найбільш ефективним і перспективним методом формування гідрогелевих мікросфер вважається метод електророзпилення [4]. Відповідно до нього діаметр утворюваних крапель при розпиленні рідкого гелеутворювача залежить від величини прикладеного електростатичного потенціалу, що на практиці забезпечується застосуванням генератора високої напруги.

Найпоширенішою клітинною складовою біоінженерних конструктів на сьогоднішній день є мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (МСК), що зумовлено їхнім високим проліферативним потенціалом та здатністю до мультилінійного диференціювання [5–8]. У науковій літературі широко освітлені підходи, що забезпечують надійне зберігання МСК у вигляді суспензії шляхом кріоконсервування. Для кріоконсервування суспензій МСК зазвичай застосовують повільне заморожування з кріопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) у

концентрації 1,5 М [9]. Також є відомості про успішне кріоконсервування МСК у складі тривимірних носіїв, в тому числі і в АМС, з ДМСО в такій же концентрації [10–12]. Однак, враховуючи, що ДМСО є токсичною речовиною і потребує видалення перед застосуванням, актуальною є розробка протоколів ефективного кріоконсервування з використанням меншої концентрації цього кріопротектора.

Для короткострокового зберігання або транспортування біологічних об'єктів більш доцільно, у порівнянні з досить складними в технічному плані методами кріоконсервування, застосовувати підходи зберігання при позитивних температурах, нижчих за фізіологічні. Відомо, що в умовах гіпотермії внаслідок порушення метаболічного та іонного гомеостазу спостерігається набухання клітин з подальшим накопиченням активних форм кисню, що, в свою чергу, викликає активацію апоптозу та структурні пошкодження [13]. Застосування спеціалізованих розчинів, що запобігають набухання клітин, серед яких найбільш відомим є розчин UW (University of Wisconsin solution) [14], зменшує ступінь пошкодження. Розроблений у відділі кріобіохімії ІПКіК НАН України сахарозо-сольовий розчин (ССР) також є досить ефективним для зберігання біологічних об'єктів в умовах гіпотермії та, на додаток, більш економічно вигідним [15]. У той же час особливості гіпотермічного зберігання клітин, вміщених у гідрогель АМС, їхній метаболічний стан та життєздатність залишаються невивченими.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертація виконана у відділі кріобіохімії Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України у рамках науково-дослідної теми «Вивчення впливу кріоконсервування на біологічні властивості стовбурових клітин різного походження при моношаровому й об'ємному культивуванні та експериментальній трансплантації» (шифр – 2.2.6.71, номер держреєстрації 0112U003132).

Мета і задачі дослідження. Метою даної роботи було визначити вплив кріоконсервування та зберігання за позитивних температур на властивості МСК, інкапсульованих в альгінатні мікросфери із застосуванням електророзпилення.

Для досягнення цієї мети були поставлені та вирішені наступні завдання:

1. Визначити та опрацювати умови отримання стабільних та однорідних за розміром і формою АМС, які містять життєздатні МСК, із застосуванням методу електророзпилення.

2. Вивчити вплив інкапсуляції в АМС із застосуванням електророзпилення на життєздатність, метаболічну активність та проліферативно-диференціювальні властивості МСК при культивуванні в складі АМС та після вивільнення з альгінатного гелю.

3. Характеризувати осмотичну відповідь та розрахувати коефіцієнти проникності цитоплазматичних мембран МСК в АМС для води та кріопротектора ДМСО.

4. Теоретично визначити та експериментально підтвердити умови ефективного кріоконсервування МСК у складі АМС, отриманих із застосуванням електророзпилення, під захистом 1 М ДМСО.

5. Дослідити вплив зберігання МСК у суспензії та у складі АМС за позитивних температур в культуральному середовищі на життєздатність, адгезивні властивості та метаболічну активність клітин.

6. Провести дослідження загальнобіологічних та специфічних властивостей МСК у суспензії та в складі АМС за умов гіпотермічного зберігання при 4 °С у спеціалізованих розчинах (ССР, UW).

Об'єкт дослідження – кріоконсервування та зберігання за позитивних температур МСК, інкапсульованих у АМС із застосуванням електророзпилення.

Предмет дослідження – загальнобіологічні та специфічні властивості МСК, інкапсульованих в АМС, до та після кріоконсервування або зберігання за позитивних температур.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи досліджень: моношарове та об'ємне культивування *in vitro*; отримання АМС із застосуванням електророзпилення; програмне заморожування; волюмометрія; фізико-математичне моделювання; спектрофотометрія; флуоресцентна спектроскопія; світлова та флуоресцентна мікроскопія; морфометричний аналіз; статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Встановлено, що МСК, інкапсульовані у АМС із застосуванням електророзпилення, зберігають в перебігу культивування високу життєздатність та функціональну активність. Вперше встановлено, що МСК у складі АМС характеризуються зворотним зниженням метаболічної активності та мембранного потенціалу мітохондрій.

На підставі осмотичної реакції МСК у складі АМС за присутності 1 М розчину ДМСО і при використанні чисельного моделювання вперше теоретично визначені параметри ефективного режиму їх кріоконсервування, результативність якого підтверджена експериментально. Вперше прийоми фізико-математичного моделювання були залучені до аналізу процесів, що протікають у клітинах, інкапсульованих в АМС.

Новими є результати, що інкапсуляція у АМС сприяє збереженню МСК за позитивних температур 22 і 37 °С при перебуванні у культуральному середовищі на основі α -МЕМ впродовж 3-х діб. Новими є дані, що використання спеціалізованих розчинів гіпотермічного зберігання (ССР, UW) забезпечує високу життєздатність МСК у складі АМС за умови їх інкубації при 4 °С, а також дозволяє подовжити термін зберігання до 7-и діб. Отримані в роботі результати надали можливість запропонувати використання інкапсуляції клітин у альгінатний гідрогель як засобу для їхнього короткострокового зберігання та транспортування.

Практичне значення отриманих результатів. Визначені основні параметри отримання однорідних за розміром та формою АМС із застосуванням електророзпилення, які були використані для інкапсуляції клітин у мікросфері. Для цього була виготовлена система з пристроєм для генерації високої напруги, яка спрощує технологію отримання АМС певного розміру і форми. Результати щодо осмотичної реакції МСК на розчин кріопротектора та подальше чисельне моделювання дозволяють теоретично обґрунтовувати і розраховувати оптимальні режими кріоконсервування клітин у складі тривимірних носіїв, зменшуючи обсяги емпіричних досліджень. Результати щодо зберігання інкапсульованих у АМС МСК за позитивних температур з використанням різних за складом

середовищ є підґрунтям для застосування даного підходу при короткостроковому зберіганні і транспортуванні клітин.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням, основні результати якого отримані безпосередньо здобувачем. Автором було проведене патентно-інформаційне дослідження наукової проблеми, спільно із науковим керівником визначені мета та завдання роботи, а також способи їхнього вирішення. Здобувачем особисто одержані експериментальні дані, проведені їхня статистична обробка та первинний аналіз, зроблені попередні висновки. Спільно з науковим керівником здійснена інтерпретація отриманих результатів і сформульовані остаточні висновки. У наукових працях, що опубліковані у співавторстві, відображені результати спільного планування, проведення експериментів та обговорення результатів.

Апробація матеріалів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на щорічних конференціях молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині» (м. Харків, 2014, 2015, 2016); XI Українському біохімічному конгресі (м. Київ, 2014); міжнародній конференції «Society for Low Temperature Biology» (м. Лондон, Великобританія, 2014); 5-му міжнародному конгресі «Cell & Stem Cell Research» (м. Чикаго, США, 2015); щорічній зустрічі кріобіологічної спільноти «Cryo-2015» (м. Острава, Чеська Республіка, 2015); 1-й конференції молодих вчених «CYS-2015» (м. Київ, 2015); міжнародній конференції «Advances in Cell Biology and Biotechnology» (м. Львів, 2015).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць, серед них 5 статей у наукових фахових виданнях, 4 з яких входять до міжнародної наукометричної бази Scopus, 2 патенти на корисну модель, 9 тез доповідей на конференціях.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 175 сторінках друкованого тексту і містить наступні розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, 3 розділи результатів власних досліджень, узагальнення, висновки, список використаних джерел та 2 додатки. Список

використаних джерел включає 290 найменувань, розміщених на 36 сторінках.
Робота проілюстрована 27 рисунками та 2 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини

В останні десятиліття мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини привертають пильну увагу фахівців різних галузей біології і медицини, а результати вивчення властивостей та поведінки цих клітин в експериментальних та клінічних умовах широко висвітлюються в великій кількості публікацій. При цьому мають місце деякі невідповідності, оскільки за допомогою аббревіатури МСК у джерелах наукової літератури могли визначатися і мезенхімальні стовбурові клітини (MSC, mesenchymal stem cells), і мезенхімальні стромальні клітини (MSC, marrow stromal cells). На теперішній час Міжнародне товариство клітинної терапії (ISCT, International Society of Cellular Therapy) визначило, що термін «мезенхімальні стовбурові клітини» є некоректним для визначення прогеніторних клітин стромального походження, оскільки для них не описано нерівномірного розподілу, при якому одна з дочірніх клітин зберігає властивості материнської клітини, а інша вступає на шлях диференціювання [5]. Запропоновано визначати як «мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини» зі збереженням аббревіатури «МСК» фібробластоподібні високоадгезивні клітини зі специфічним імунофенотипом (CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻ або CD11b⁻, CD79α або CD19⁻, HLA-DR) і здатністю до індукованого диференціювання *in vitro* в ортодоксальних напрямках (адипо-, остео- та хондрогенному) незалежно від джерела їх отримання, а клітини, для яких показані конкретні специфічні особливості стовбурових клітин - як мезенхімальні стовбурові клітини. При цьому відзначено, що до МСК у запропонованому широкому розумінні належать як ранні (стовбурові) клітини-попередники, так і їхні комітовані нащадки [16]–22].

Підвищений інтерес до МСК обумовлений їхньою високою проліферативною активністю, унікальним диференціальним потенціалом, низькою імуногенністю та імуномодулюючими властивостями [23–25]. Відкриття МСК належить А.Я.Фріденштейну зі співробітниками, які вилучили з кісткового мозку експериментальних тварин субстрат-залежні клітини, здатні до

клоногенного росту, і описали їх як колонієутворюючі одиниці фібробластів [26]. На сьогодні особлива увага приділяється МСК у зв'язку з їх здатністю диференціюватися у різні клітинні типи [27–29]: вони мають потенціал до диференціювання в остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках [30–32], а також здатні диференціюватися у нейроцити [33–35], кардіоміоцити [36–38], гепатоцити [39–41] та інші типи клітин.

Найбільш повно вивченим джерелом отримання МСК є кістковий мозок дорослих донорів. Останнім часом з'явилося багато робіт, присвячених пошуку нових джерел отримання МСК [42]. Серед них повідомлення про вилучення МСК з жирової [43], м'язової [44], нервової [45] тканин, шкіри [46], периферичної [47] і кордової крові [48], плаценти [49], амніотичної рідини [50], ембріональних/фетальних тканин [51], проте питання про еквівалентність МСК з різних джерел залишається відкритим. Так, наприклад, показано, що МСК, вилучені з окістя, мають більшу здатність до формування кісткової тканини *in vivo*, ніж МСК із синовіальної оболонки [52]. Виявлений вплив віку донора на властивості МСК: зі збільшенням віку спостерігається зниження проліферативного потенціалу МСК кісткового мозку [53]. С. Götherström зі співавторами [54] показали різний рівень експресії генів, що відносяться до регуляції диференціювання, проходження клітинного циклу, структури хроматину, системи репарації ДНК, в МСК фетальної печінки і кісткового мозку дорослих донорів. Результати зазначеної роботи показали, що МСК фетального походження мають великий проліферативний потенціал і є менш комітованими, ніж МСК дорослого організму, проте їхнє використання пов'язане з ланкою етичних проблем.

Особливий інтерес як джерело МСК являє собою дерма дорослої людини, використання якої дозволяє виключати етичні та юридичні проблеми, відкриваючи нові й ширші перспективи в області регенеративної медицини і тканинної інженерії [55–58]. Показано, що в ході селективного моношарового культивування адгезивних клітин дерми протягом 3-4-х пасажів можуть бути отримані культури фібробластоподібних клітин, які характеризуються активною

проліферацією і здатністю формувати колонії різного розміру [59]. Ефективність колонієутворення досліджуваних клітин може становити понад 10 %. Цитофлуориметричні дослідження показали, що клітини, отримані з дерми дорослої людини, мають фенотип, характерний для МСК, а саме CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ [60]. Клітини, отримані з дерми дорослої людини, здатні диференціюватися в ортодоксальних напрямках під впливом індукуючих агентів *in vitro* [61]. На підставі аналізу фенотипу, проліферативних і диференціювальних властивостей фібробластоподібні клітини дерми дорослої людини, отримані при селективному культивуванні *in vitro*, можуть бути віднесені до мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин. Наведені вище властивості МСК дерми дорослої людини, а також доступність цього біоматеріалу слугували підґрунтям для вибору цих клітин в якості предмета нашого дослідження.

Унікальний потенціал до мультилінійного диференціювання і здатність до імунорегулюючої дії *in vivo* МСК, отриманих з тканин дорослого організму, дозволяють успішно застосовувати ці клітини при лікуванні ряду патологій, включаючи серцево-судинні [62], ендокринні [63], неврологічні [64], дегенеративні [65–67], імунологічні [68] захворювання та ін. Надходження цих клітин до організму можливе шляхом системного введення в кровоток або при місцевому застосуванні. В обох випадках МСК піддаються прямій дії клітинних та неклітинних чинників і систем цілісного організму. Крім того, МСК, в диференційованому або недиференційованому стані, можуть бути доставлені в організм реципієнта у складі носіїв на основі різних біоматеріалів [69]. Перевагою останнього підходу в порівнянні з системним введенням МСК є локальність застосування, що забезпечує зниження ризику побічних ефектів на інші органи і тканини. З іншого боку, носій може тим чи іншим чином захищати клітинну складову біоінженерного імплантату від дії факторів організму реципієнта.

1.2. Інкапсуляція клітин у альгінатні мікросфери

Одним з перспективних і багатообіцяючих методів тканинної інженерії є інкапсуляція клітин у мікросфери, що виготовлені з різних матеріалів природного і синтетичного походження [70–73]. Основними вимогами, які висуваються до матеріалів, що використовуються для інкапсуляції клітин, є біосумісність, можливість стерилізації, тривала біологічна стійкість, відсутність агресивних хімічних компонентів і можливість формування тривимірних структур за фізіологічних умов [74]. Остання вимога має дуже велике значення, оскільки процес формування гелевих мікросфер відбувається при одночасному використанні гелюючих хімічних розчинів та клітинних суспензій. Крім того, певна перевага може віддаватися матеріалам природного походження, процес утворення мікросфер з яких не завдає шкоди життєздатності клітин [75, 76].

У виборі матеріалу для інкапсуляції клітин визначальними чинниками є проникність, мікроструктура і міцність сформованих з нього тривимірних структур. Часткова проникність повинна забезпечувати, з одного боку, достатню імуноізоляцію клітин, а з іншого - безперешкодну дифузію необхідних поживних речовин і продуктів секреції. Мікроструктура носія пов'язана з будовою молекул, з яких він формується, і визначає топографію зовнішньої поверхні, від якої залежить ступінь вираженості реакції реципієнта на імплантат [77]. Міцність носія відображає його механічну стійкість до зовнішнього фізичного впливу [78]. Ці вимоги зумовили те, що для виготовлення мікросфер найчастіше використовуються природні або синтетичні полімерні матеріали, здатні формувати пористі гідрогелі.

Гідрогелі належать до класу синтетичних або природних полімерних тривимірних структур, які набухають, але не розчиняються у воді [79–81]. Протягом багатьох років гідрогелі широко застосовуються для створення імуноізолюючих бар'єрів у вигляді оболонок і можуть служити в якості матриксу мікросфер для іммобілізації біологічного матеріалу. Т.М.С.Chang вперше з метою створення штучних органів використав гідрогелеві мікросфери, покриті поліелектролітною мембраною [82], яка виконувала основну бар'єрну функцію, що і визначило назву технології «інкапсуляція». На сьогоднішній день технологія

інкапсуляції передбачає заключення клітин у пористі носії сферичної геометрії, що мають різний розмір і структуру. Завдяки значному поширенню метода і для збереження єдності термінології та оптимізації процесів виготовлення існує гнучка класифікація одержуваних носіїв, в основі якої лежить їхня форма і розмір [83]. Проте в науковій літературі термін «інкапсуляція» іноді застосовується і стосовно заключення біоматеріалу в носії несферичної форми [84].

Дифузійні характеристики мікросфер залежать від співвідношення «площа поверхні/об'єм», а геометричні параметри повинні відповідати ідеальній сфері [85, 86]. Змінювати дифузійні і механічні властивості мікросфер можна за допомогою модифікації фізико-хімічних параметрів полімеру (молекулярна вага, відсотковий вміст твердих частинок, рН) і технології його виготовлення (ступінь очищення, додаткові реагенти, однорідність сформованого гідрогелю) [87]. Важливою умовою для ефективного функціонування мікросфер є дотримання оптимального балансу між ступенем проникності для поживних речовин і механічною міцністю до зовнішніх впливів [88–90].

За останні десятиліття з метою отримання мікросфер було досліджено багато матеріалів: хітозан [91], агароза [92], полі(гідроксиетилметакрілату-метил метакрілат) (HEMA-MMA) [93], сополімер акрилонітрилу (AN69) [94], поліетиленгліколь (PEG) [95] та ін. Однак, в силу вищеописаних вимог, на даний час найбільш ефективним та часто використовуваним матеріалом для інкапсуляції клітин є альгінат і його похідні [96]. Альгінат – це лінійний негативно заряджений природний полісахарид, що включає розташовані у певному чергуванні GG/GM/MM-блоки різної довжини з 1-4-зв'язаних залишків β -D-мануронової (M) та α -L-гулууронової (G) кислот. Альгінат отримують з морських водоростей переважно класу *Phaeophyceae* або бактерій [97–99]. Зазвичай для інкапсуляції альгінат використовується ізольовано або в поєднанні з позитивно зарядженими полікатионами з формуванням альгінат-поліелектролітних комплексів [100]. Крім того, іонізований альгінат може зв'язуватися з двовалентними катіонами Ca^{2+} , Br^{2+} або Sr^{2+} , формуючи пористий гідрогель за рахунок поперечних зшивок GG/GM-

блоків (GG-GG; GM-GG; GM-GM) між собою [101]. Подібний тип сформованих структур в літературі отримав назву «egg box model» [102, 103].

На сьогоднішній день альгінат є достатньо вивченим матеріалом для інкапсуляції різних типів клітин, при цьому розглянуті біосумісність та структурні властивості гідрогелю, що формується з альгінату. Встановлено, що зміни у макроструктурі, внутрішній мікроархітектурі та механічних властивостях альгінатного гідрогелю безпосередньо впливають на поведінку іммобілізованих клітин [104–107].

Ефективна дифузія розчинених речовин всередину та назовні носія (скафолда), який використовується для іммобілізації клітин, зокрема альгінатного гідрогеля, є істотною властивістю скафолдів для забезпечення їхньої біосумісності [108, 109]. Модифікації форми альгінатного гідрогеля та внутрішнього розміру пор здатні впливати на життєздатність іммобілізованих клітин переважно за рахунок зміни ефективного переносу поживних речовин та кисню всередину, а також виведення продуктів метаболізму з альгінатних мікросфер [110] крізь пори різного розміру. Так, показано, що збільшення пористості альгінатного гелю здатне підвищувати швидкості виведення аміаку клітинами гепатокарциноми [107] та секреції альбуміну гепатоцитами [104]. Таким чином, показники життєздатності клітин, що інкапсульовані в АМС, можуть залежати від зміни розміру пор за рахунок, наприклад, заміщення альгінатного полімеру гідроксиетилцелюлозою, що у свою чергу призводить до розширення пор, що формуються.

Виявлено, що проникність альгінатних гелів змінюється в залежності від їхньої форми [106] та стабільності [105]. Збільшення концентрації альгінату від 1,5 до 3 % призводить до уповільнення руху різних розчинених речовин крізь гель, при цьому внутрішній діаметр пор 3 %-го альгінатного гелю менший (147 Å), ніж внутрішній діаметр пор 1,5 %-го альгінатного гелю (170 Å) [105]. За більш детального вивчення встановлено, що внутрішній діаметр пор 0,3 %-го (вага/об'єм) гелю становить від 0,2 до 3,0 мкм, 0,6 %-го (вага/об'єм) гелю - від 0,1 до 1,0 мкм, а 1,2 %-го (вага/об'єм) гелю - від 0,1 до 0,4 мкм. Проникність

альгінатного гелю також визначається вмістом маннуринової та гулуринової кислот [111, 112]. Зазвичай на практиці використовуються альгінати з високим вмістом маннуринової кислоти (близько 70 %) та низьким вмістом гулуринової кислоти (близько 30 %). Співвідношенням кислот М:G можна маніпулювати задля збільшення проникності гелів з метою підвищення життєздатності інкапсульованих клітин. Альгінати з високим вмістом маннуринової кислоти є більш біологічно сумісними і клінічно відповідними, ніж альгінати з високим вмістом гулуринової кислоти [112, 113].

Незважаючи на загальні характеристики альгінатного гідрогелю та його структури, показані різні механізми гелеутворення, що відповідно формують різні структури, які, певно, характеризуються різними властивостями. Саме механізми гелеутворення контролюють гомогенність АМС [83]. Відомо п'ять механізмів гелеутворення, до яких належать: зовнішнє, внутрішнє, зворотнє, гелеутворення на межі розподілу фаз, а також багат шарове поетапне гелеутворення. Зовнішнє гелеутворення є класичним і, напевно, найбільш широко використовуваним механізмом іотропного гелеутворення, в першу чергу, за рахунок його простоти та ефективності. У цьому процесі іони Ca^{2+} , найбільш розповсюдженого агента для формування альгінатних гідрогелів, вводяться ззовні відповідно до крапель альгінату. Іони Ca^{2+} дифундують всередину крапель, де між полімерними ланцюгами альгінату ініціюють зшивки шляхом утворення кальцієвих містків. При контакті іони Ca^{2+} починають зшивання в першу чергу полімерних ланцюгів альгінату, що перебувають на периферії краплі. На початку це призводить до формування напівтвердої мембрани, що оточує краплю з рідким ядром [114–116]. Подальше утримання крапель у гелюючому розчині призводить до більш глибокої дифузії Ca^{2+} крізь мембрану за рахунок градієнту концентрацій, що згодом приводить до затвердіння ядра краплі. Таким чином, утворюється сфера, яка являє собою зшиті випадковим чином полімерні ланцюги альгінату. Подібні сфери відіграють роль матриці для матеріалу, що інкапсулюється. Проте оскільки перехресне зшивання ініціюється на периферії альгінатної краплі, ланцюги альгінатного полімеру тягнуться до периферії, щоб забезпечити достатнє

зшивання [117]. У процесі подібного зшивання кількість ланцюгів альгінату в середині краплі (у ядрі) стає меншою та розбавляється з часом. Після повного закінчення гелеутворення переважна більшість зшитих за рахунок Ca^{2+} ланцюгів альгінату буде розташована на периферії. Таким чином, реально формуються неоднорідні АМС, кількість альгінату, фізичні та структурні властивості яких значною мірою варіюють навіть у межах однієї капсули.

Формування неоднорідного гідрогелю може обмежувати застосування механізму зовнішнього гелеутворення за умови інкапсуляції живих клітин. Більш щільна периферична матриця уповільнює обмін розчинених речовин між внутрішнім і зовнішнім середовищами [118–121]. Життєво необхідні сполуки, такі як кисень та поживні речовини, не можуть вільно та ефективно транспортуватися до центру сфери крізь великий дифузійний бар'єр. Крім того, токсичні продукти метаболізму не можуть ефективно вивільнятися зі сфери. В результаті живі клітини, що розташовані у ядрі АМС, можуть знаходитися під великим ризиком загибелі за рахунок розвитку некрозу. Проте, незважаючи на подібні недоліки, завдячуючи простоті у використанні, економічним перевагам та можливості отримання позитивних результатів, використання зовнішнього гелеутворення для інкапсуляції клітин у АМС залишається найбільш розповсюдженим.

Зазвичай процес інкапсуляції включає основні, базові етапи: клітини поміщують в 1-3 % розчин альгінату, потім на 5 хвилин мікрокраплі вносять в ємність з 1-2 % CaCl_2 . Після цього, з метою формування зовнішнього захисного шару, мікросфери зазвичай занурюють в ємність з 0,05-0,1 % розчином полі-L-лізину або іншого полікатіону [122, 123]. Описаний підхід вперше протестували F. Lim і A.M. Sun при уведенні інкапсульованих бета-клітин щурам [124], отримавши через 2-3 тижні після імплантації мікросфер тимчасову компенсацію експериментального цукрового діабету. Нетривалий функціональний ефект пересадки автори пояснили розвитком реакції реципієнта на чужорідне тіло, зумовленої низькою біосумісністю мікросфер. Інші експериментальні дослідження на моделі цукрового діабету у мишей показали можливість тривалої,

від декількох місяців до одного року, керованої нормогликемії після трансплантації мікроінкапсульованих бета-клітин без застосування імуносупресії [125]. Було встановлено, що відповідь реципієнта на трансплантат (АМС) переважно залежить від природи використовуваного альгінату. У клінічних умовах технологія мікроінкапсуляції на основі альгінату, що містить різну у відсотковому співвідношенні кількість гулуранової кислоти, вперше застосовувалась Р. Soon-Shiong et al. [126] при інтраперитоніальній аллотрансплантації бета-клітин пацієнту з цукровим діабетом I типу. На фоні імуносупресивної терапії протягом 9 місяців була досягнута інсулінонезалежність, а показники глікемії перебували в фізіологічному діапазоні.

З урахуванням того, що життєздатність та властивості інкапсульованих клітин певною мірою залежать від розміру та форми АМС, на сьогоднішній день розроблена велика кількість методів і технологічних підходів, які забезпечують високу продуктивність процесу отримання та якість одержуваних мікросфер з клітинами. В основі найбільш простого методу формування мікросфер лежить принцип природного відриву крапель альгінату від голки [123]. Маса краплі m буде визначатися рівновагою між впливом сили тяжіння mg і силою, що підтримує краплю на голці (добуток поверхневого натягу γ і периметра голки $2\pi d_e$; закон Тейта):

$$mg = 2\pi d_e \gamma \quad (1)$$

де: d_e - зовнішній діаметр голки. Діаметр краплі буде визначатися рівнянням 2:

$$d = (6m/\pi\gamma)^{1/3} \quad (2)$$

Однак з використанням даного підходу діаметр одержуваних мікросфер, як правило, становить не менше 1,5 мм навіть при дуже незначному периметрі голки. Тому інтерес застосування даного підходу зазвичай обмежується лабораторними дослідженнями. Застосування різних технічних модифікацій дозволяє зменшити і навіть регулювати діаметр одержуваних мікросфер в досить вузьких межах.

Найбільш новим і ефективним методом отримання однорідних за розміром та формою мікросфер є електророзпилення або формування мікросфер під

впливом електростатичного потенціалу. Принцип електростатичної генерації крапель (електророзпилення) був найбільш повно сформульований професором D. Poncelet [127–129] і полягає в наступному. Поверхневий натяг γ є головною силою, яка підтримує краплю, що висить, на голці. Застосування електростатичного потенціалу сприяє міграції заряджених молекул до поверхні краплі. Ці молекули відштовхуються одна від одної, за рахунок чого поверхневий натяг зменшується. Згідно до електрокапілярної теорії Ліпмана рівновага поверхневого натягу γ зарядженої поверхні рідини зменшується зі збільшенням електростатичного потенціалу U , як це виражено формулою (3):

$$d\gamma = -\sigma dU \quad (3)$$

де: σ - електричний заряд поверхні. Якщо припустити, що крапля, яка висить, є сферою, що знаходиться під впливом електростатичного потенціалу U , то середня щільність поверхні електричного заряду σ може виражатися рівнянням (4):

$$\sigma \approx \frac{q_0}{\pi d^2} = 2\varepsilon_0 \frac{U}{d_c} \quad (4)$$

де: q_0 - поверхневий заряд, d - діаметр краплі, ε_0 - діелектрична постійна повітря, d_c - внутрішній діаметр голки. Поєднуючи обидва рівняння і інтегруючи по електричному потенціалу U , можна отримати вираз коефіцієнта поверхневого натягу в залежності від електростатичного потенціалу U (рівняння 5):

$$\gamma = \gamma_0 \left(1 - \frac{\varepsilon_0 U^2}{d_c \gamma_0}\right) = \gamma_0 \left(1 - \frac{U^2}{U_c^2}\right) \quad (5)$$

де: γ_0 - поверхневий натяг рідини за $U = 0$, U_c - критичний електричний потенціал, який виражається наступним рівнянням (6):

$$U_c \approx \sqrt{\frac{d_c \gamma_0}{\varepsilon_0}} \quad (6)$$

Поблизу цього значення, поверхневий натяг буде ставати дуже незначним і розмір крапель буде майже не залежати від збільшення доданого електричного потенціалу.

Маса краплі, що відривається, визначається з умови рівності суми сили тяжіння mg плюс електрична сила F_e до сили поверхневого натягу $2\pi d_s \gamma$:

$$mg + Fe = 2\pi d_s \gamma \quad (7)$$

$$Fe = \pi \varepsilon_0 (d/2h)^2 U^2 \quad (8)$$

де: ε_0 - діелектрична проникність повітря, h - відстань між краплею, що висить, і гелюючим розчином, а d_s - діаметр місця, від якого відриваються краплі.

Таким чином, збільшення електричного потенціалу U до критичного значення U_c буде приводити до зменшення розміру краплі d , яка буде витягуватися у вигляді тонкого струменя з подальшим розпадом на маленькі краплі. Основну роль в зменшенні діаметра крапель відіграє саме зниження поверхневого натягу рідини під впливом електростатичного потенціалу.

На практиці зниження поверхневого натягу рідини забезпечується за рахунок застосування генераторів високої напруги, здатних виробляти до 35 кВ і навіть вище. Подібні пристрої можуть створювати високий електростатичний потенціал між голкою і резервуаром для гелюючого розчину. Проте, незважаючи на можливість отримання шляхом електророзпилення АМС, що найбільше відповідають сучасним вимогам, використання даного підходу має низку обмежень. По-перше, не існує комерційних пристроїв для генерації високої напруги, які б застосовувалися з метою отримання АМС. Зазвичай задля вирішення даної задачі дослідники використовують власноруч сконструйовані прилади, які різняться між собою за технічними характеристиками і, тим самим, за умовами одержання АМС. По-друге, залишається відкритим питання про функціональний стан конкретного типу клітин після інкапсуляції в АМС з використанням пристрою для електророзпилення з певними технічними характеристиками.

Найбільшого розвитку технологія інкапсуляції в АМС досягла в галузі використання бета-клітин підшлункової залози для трансплантації з метою корекції інсулінової залежності [130–133]. Застосування інкапсульованих живих клітин показало свою ефективність також при пересадці хондроцитів [134], гепатоцитів [135], астроцитів [136, 137] і МСК [10, 138]. Наприклад, Aoki Takeshi et al. [139] імплантували гепатоцити, інкапсульовані в альгінат-полі-L-лізин-альгінат, внутрішньоочеревинно щурам Lewis з частковою гепатектомією і

відзначили значне поліпшення функції печінки в порівнянні з контрольною групою тварин протягом довготривалого періоду спостереження. Уведення стовбурових клітин, інкапсульованих в альгінат-полі-L-лізинові мікросфери, щурам Sprague-Dawley з експериментальним пошкодженням спинного мозку дозволило досягти позитивних результатів, зафіксованих за допомогою клінічних і гістологічних методів [140].

На даний час більшість наукових і клінічних досліджень спрямована на досягнення тривалої біосумісності і механічної стабільності мікросфер [83]. Встановлено, що мікросфери, які містять клітини, деградують швидше, ніж безклітинні мікросфери [141, 142]. З іншого боку, причиною деградації і загибелі клітин вважаються зміни іонізації і рН-середовища у внутрішньокапсульному просторі. Подібні хімічні зміни, поряд з механічним стресом, викликаним імплантацією мікросфер, імовірно призводять до ослаблення захисного шару гідрогелю. З метою поліпшення фізико-хімічних параметрів АМС було запропоновано велику кількість методологічних підходів: формування ковалентних перехресних зв'язків в межах зовнішнього захисного шару [143], зв'язування альгінату з барієм замість кальцію (для підвищення стабільності) [144, 145], додавання альгінатного покриття у якості зовнішнього шару альгінат-полі-L-лізинових капсул (для підвищення біосумісності) [146], визначення оптимальної в'язкості і ступеня очищення [147, 148], використання модифікованого хитозаном, PEG та іншими компонентами альгінату [149], вибір оптимального співвідношення гулурунової і маннурунової кислот при отриманні альгінату [150]. Але, незважаючи на численні зусилля, оптимізація процесу отримання мікросфер, що виступають носіями різних клітинних типів, не може вважатись досягнутою і потребує подальшого вдосконалення, що визначило напрямок нашої роботи в технологічному аспекті.

1.3. Загальні принципи кріоконсервування та гіпотермічного зберігання клітин

1.3.1. Кріоконсервування клітин

Кріоконсервування - технологічний процес, що складається з ряду етапів: експозицію з кріозахисним розчином, власне заморожування, подальше зберігання біологічного матеріалу за наднизьких температур зі збереженням їхньої життєздатності після розморожування і відігрів консервованого біоматеріалу перед застосуванням. Кріоконсервування широко застосовується в різних сферах діяльності людини, включаючи збереження генетичного біорізноманіття, в репродуктивних технологіях, при заготівлі крові та її компонентів і т.п.

Сучасна ера медичної кріобіології починає свій відлік з 1949 р., коли В. Луєт опублікував перші результати досвіду кріоконсервування еритроцитів. Вже тоді багато дослідників основну увагу зосередили на вивченні механізмів руйнування клітин в момент їх заморожування.

Заморожування водних розчинів відбувається в дві стадії: при зниженні температури розчину у першу чергу кристалізується вода, при цьому концентрація розчинених у незамерзлій поки воді речовин підвищується і потрібне подальше зниження температури для кристалізації незамерзлої частини розчину. У зв'язку з наявністю в клітинній структурі і міжклітинній речовині значної кількості води, процес кристалізації при заморожуванні клітинних суспензій протікає аналогічно процесам в водних розчинах. Тому фазовий перехід води з рідкого в твердий стан при заморожуванні клітин відбувається в широкому температурному діапазоні - від температури початку кристалізації до повного замерзання. Динаміка зміни температури в цьому інтервалі впливає на характер кристалізації [151].

В результаті досліджень з'ясувалося, що основна маса пошкоджень клітинних структур в процесі заморожування пов'язана з утворенням кристалів льоду [152]. Кристалізація води починається в позаклітинному просторі, внаслідок росту кристалів збільшується концентрація солей в позаклітинному розчині. Високі концентрації солей в позаклітинному середовищі в свою чергу призводять до виникнення на плазматичній мембрані клітини градієнта осмотичного тиску і таким чином до дегідратації клітин [153, 154].

У 1976 році була висунута гіпотеза холодової деструкції клітин, згідно з якою клітинна мембрана є первинною мішенню дії кристалів льоду і осмотичних факторів при заморожуванні, що згодом впливає на життєздатність самих клітин [Білоус А.М. 1997]. Зниження температури впливає на взаємодії між білками і подвійним ліпідним шаром клітинної мембрани, що призводить до порушення мембранного транспорту і може викликати загибель клітин.

За умов охолодження змінюється характер метаболічних процесів в клітинах і порушуються життєво важливі процеси. Сповільнюється рух різних молекул і органел в клітинах, змінюються в'язкість і фізико-хімічні властивості розчинів, білків та інших комплексів, знижується швидкість протікання біохімічних реакцій, порушується активність ферментів, змінюється регуляція внутрішньоклітинного обміну [155].

Засобами збереження життєздатності клітин в процесі заморожування є управління процесом охолодження і використання кріопротекторів. Кріопротектори - речовини, які можуть попереджати розвиток кріоушкоджень біологічних об'єктів і забезпечувати їхню життєздатність після розморожування.

До теперішнього часу виявлено близько 120 органічних речовин, які мають кріопротекторні властивості. Усі кріопротектори можна розділити за наступними критеріями:

- ендоцелюлярні – речовини, що проникають крізь клітинну мембрану, з молярною масою до 100 г/моль;
- екзоцелюлярні – речовини, що не проникають крізь клітинну мембрану, з молярною масою понад 400 г/моль;
- змішаної дії - речовини з молярною масою від 100 до 400 г/моль.

Ендоцелюлярні кріопротектори вважаються найбільш ефективними, проте, завдяки високій проникності, вони характеризуються і найбільшою токсичністю [156–158]. Тому на сьогоднішній день залишається актуальним питання щодо відмови або, принаймні, щодо зменшення концентрації токсичних кріопротекторів та пошуку нових сполук з кріопротекторними властивостями, які би були нетоксичними для біологічних об'єктів.

Загальний принцип дії кріопротекторів при заморожуванні полягає в зв'язуванні води, що приводить до зниження швидкості кристалізації і уповільнення росту кристалів льоду і таким чином дозволяє вберегти клітину від осмотичного лізису [159, 160]. Механізм дії ендоцелюлярного кріопротектора реалізується за рахунок зв'язування внутрішньоклітинної води при швидкому проникненні крізь мембрану. Екзоцелюлярні кріопротектори зв'язують позаклітинну воду і при заморожуванні уповільнюють зростання позаклітинних кристалів льоду, оточують клітини і перешкоджають впливу на них вже сформованих кристалів [161, 162].

Слід зазначити, що до теперішнього часу не існує універсальних принципів підбору кріопротектора. Вибір кріопротектора здійснюється емпірично, індивідуально для кожного типу клітин. Проте можна сформулювати основні загальні вимоги до кріопротекторів. Кріопротектори повинні:

- зберігати клітини в життєздатному стані;
- забезпечувати кріозахисну дію при мінімальній концентрації ;
- бути малотоксичними на клітинному і організмовому рівнях;
- добре розчинятися у воді.

Протягом останніх років для кріоконсервування МСК застосовували різні види кріопротекторів, однак найкращі результати на сьогодні дає використання диметилсульфоксиду (ДМСО). Молекула ДМСО є невеликою високо полярною амфіфільною молекулою з гідрофільною групою сульфоксиду і двома гідрофобними метил-групами. Рідкий ДМСО добре проникає крізь плазматичні і внутрішньоклітинні мембрани, утворюючи комплекси з водою, солями та високомолекулярними біологічними речовинами [163, 164].

Для успішного заморожування клітин різних типів потрібна певна оптимальна концентрація ДМСО. При цьому необхідно враховувати вплив ДМСО на клітинну мембрану при його додаванні в клітинну суспензію ще до початку заморожування. Відомо, що різна концентрація ДМСО по-різному впливає на процес кристалізації. Моделювання бішарових систем клітинної мембрани показало, що вплив ДМСО на подвійний ліпідний шар залежить від концентрації

ДМСО в розчині [165]. При проникненні молекул ДМСО всередину фосфоліпідного бішару мембрани клітини, при концентрації ДМСО від 2,5 до 7,5 % включно, спостерігається зменшення його товщини. При концентраціях ДМСО від 10 % і вище, крім зменшення товщини бішару, спостерігається формування гідрофільних пор і дефектів у клітинній мембрані. Концентрація ДМСО, що перевищує 20 %, призводить до повної руйнації ліпідного бішару мембрани [166–168].

Для кріоконсервування МСК кінцева концентрація ДМСО 10 % є найбільш поширеною [169–171]. При цьому в ряді досліджень повідомляється, що при використанні концентрації ДМСО від 5 до 10 % збереженість МСК практично не відмінна [172–174]. При цьому було показано краще збереження МСК при використанні 10 % ДМСО в порівнянні з 5 %. Встановлено, що зниження концентрації ДМСО нижче 5 % приводить до значних втрат МСК, а концентрація вище 10 % не забезпечує підвищення збереженості МСК, але є небезпечною як для клітин, так і для пацієнта. Таким чином, мінімальна ефективна безпечна концентрація ДМСО для МСК може коливатися в межах від 5 до 10 % [175].

Крім вибору оптимальної концентрації кріопротектору, актуальними є і умови його введення. Відомо, що процес гідратації ДМСО супроводжується екзотермічною реакцією, яка може привести до загибелі МСК при їх змішуванні з кріопротектором [176, 177]. Зазвичай додавання ДМСО рекомендують проводити на крижаній бані або у попередньо охолоджену до 4 °С суспензію клітин. Однак в деяких випадках рекомендується уникати охолодження трансплантаційного матеріалу і використання крижаної бані при введенні ДМСО. До складу кріопротекторного розчину для зниження токсичної дії ДМСО, часто вводять додаткові компоненти. Наприклад, декстран проявляє властивості екзоцелюлярного кріопротектора і додатково захищає клітину при заморожуванні [178, 179].

Технологія кріоконсервування МСК постійно вдосконалюється і її ефективність багато в чому залежить не тільки від кріопротекторів, але і від самої методики заморожування. Швидкість заморожування зразків МСК, яка б

забезпечувала найкращі результати, давно і широко обговорюється. На сьогоднішній день вважаються стандартом протоколи кріоконсервування МСК з використанням контрольованого заморожування, які базуються на повільній швидкості заморожування зразка до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}/-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ з подальшим його зануренням в рідкий азот [180]. При контрольованому заморожуванні МСК використовують швидкість охолодження $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до температури близько $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Потім процес заморожування продовжують зі швидкістю близько $3-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до температури $-80\text{ }^{\circ}\text{C}/-120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Починаючи з 80-х років минулого століття, досліджувалась можливість неконтрольованого заморожування зразків кісткового мозку, а потім і периферійної крові, до температури $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, при використанні низькотемпературних холодильників [181]. При цьому тару з біоматеріалом і кріопротектором відразу вміщували в камеру холодильника ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Було встановлено, що неконтрольований метод є безпечним і показує результати, подібні до контрольованого заморожування МСК кісткового мозку, периферійної і пуповинної крові. Проте подібні підходи не були визнані як коректні та не набули широкого розповсюдження.

Слід мати на увазі, що технології, розроблені для кріоконсервування клітинних суспензій, зокрема МСК, можуть не підходити для клітин у складі АМС [182]. Це обумовлено зміною швидкості розподілу води і кріопротекторів між клітинами, а також середовищем при заморожуванні-відігріванні. В процесі кріоконсервування клітин у складі АМС необхідно враховувати, що протоколи повинні забезпечувати не тільки збереження морфофункціональних властивостей клітин, але і структурну цілісність носія, механічне пошкодження якого неминуче призведе до загибелі інкапсульованих в нього клітин.

На сьогоднішній день вже показана можливість кріоконсервування різних типів клітин [183–186], і особливо МСК, у складі АМС шляхом вітрифікації або повільного заморожування під захистом ДМСО. Так, в роботі [187] проведено порівняльне вивчення МСК у складі АМС і у вигляді суспензії окремих клітин при кріоконсервуванні: під захистом 10 % ДМСО не було виявлено суттєвої

різниці в їхніх кріочутливостях, а в присутності 5 % вони мали більш низькі показники життєздатності. Значення збереженості і метаболічної активності після кріоконсервування МСК у складі АМС збільшувалися при підвищенні концентрації ДМСО з 5 до 10 %. Ініціація кристалізації в ході повільного програмного заморожування МСК у складі АМС в присутності 10 % ДМСО дозволила досягти максимальних значень збереженості і метаболічної активності інкапсульованих клітин.

У роботах [12, 188] була показана можливість застосування технології інкапсуляції з використанням альгінату для збільшення життєздатності клітин після кріоконсервування, а також для підтримки нормальної швидкості їх проліферації після відігріву. Мікроскопічні спостереження показали, що низькотемпературна обробка і подальший відігрів істотно не впливають на морфологію альгінатних мікросфер - вони були стабільними і округлої форми. Результати аналізу після кріоконсервування життєздатності, проліферативної та функціональної активностей МСК показали перевагу інкапсульованих в альгінатні гідрогелеві мікросфери клітин у порівнянні з неінкапсульованими клітинами. Ці відомості, а також висока зацікавленість щодо встановлення вискоефективних режимів заморожування тканино-інженерних конструкцій з МСК, зокрема АМС з МСК, при зменшенні концентрації кріопротектора в кріозахисному середовищі спонукали нас до проведення досліджень в цьому напрямку.

1.3.2. Гіпотермічне зберігання клітин

Транспортування культур живих клітин є значною проблемою за умови віддаленості лабораторій та терапевтичних установ. Існуючі вирішення проблеми більшою мірою включають кріоконсервування та/або холододовий ланцюг, які є непрактичними, економічно витратними та технічно складними заходами, оскільки вони або вимагають спеціального матеріально-технічного забезпечення, або можуть бути реалізовані лише за умови коротких проміжків часу доставки [189]. Альтернативні підходи можуть поліпшити та спростити проблему.

Гідрогель, який є структурно стійким у широкому інтервалі температур, біосумісний для інкапсульованих клітин та легко піддається розчиненню, що забезпечує швидке вивільнення інкапсульованих клітин, може бути саме такою альтернативою.

Було показано, що інкапсуляція клітин може сприяти їхньому збереженню за низьких позитивних температур без застосування спеціалізованих середовищ і добавок. Так, в роботі *Bo Chen et al* [84] МСК людини і ЕСК миші успішно зберігалися у складі альгінатного гідрогелю протягом 5 днів за кімнатної температури (18-22 °С) в герметичних умовах. Життєздатність після вивільнення з альгінатного гідрогелю, становила 74 % для МСК людини і 80 % для ЕСК миші, що можна було порівняти з даними кріоконсервування. Важливим є те, що рівень проліферації і визначення основних маркерів стовбурових клітин щодо МСК людини і ЕСК миші, вивільнених з альгінатного гідрогелю, були такими ж, як і у групи кріоконсервованих клітин. У роботі *Swioklo Stephen et al* [190] описані дослідження щодо гіпотермічного зберігання (4-23 °С) МСК, що отримані з жирової тканини дорослої людини, за умови їх інкапсуляції у 1,2 % альгінат. Такий підхід дав добрі результати впродовж 72 годин зберігання, при цьому збереженість клітин великою мірою залежала від температури, оптимальними були 15 °С. При даній температурі інкапсуляція у альгінат сприяла збереженню життєздатності клітин та їхніх адгезивних характеристик після повернення в умови моношарового культивування. Після прикріплення, клітини залишалися нормальними за фенотипом, демонстрували характерну кінетику росту і здатність до індукованого диференціювання.

У той же час залишається невирішеним питання про збереження інкапсульованих клітин за 4 °С без використання спеціалізованих середовищ і добавок. У роботі *Swioklo Stephen et al* [190] було показано, що після 72 годин перебування при 4 °С неінкапсульовані МСК характеризувалися значним зниженням життєздатності, яка становила лише 18 % від початкового рівня, у той час як інкапсуляція дозволяла значно покращити цей результат. Є відомості про вплив гіпотермічного зберігання при 4°С протягом 24 годин на життєздатність і

активність ферментів клітин нирок новонароджених хом'ячків з підвищеною експресією альфа-L-ідуронідази (IDUA) [191]. Показано, що клітини у складі АМС з 1 %-го альгінату демонстрували незначне зниження активності ферменту, у той час як клітини у складі АМС з 1,5 %-го альгінату характеризувалися значеннями в три рази більшими, ніж до зберігання. Mahler Stephan et all. [192] провели аналіз захисної дії альгінатного гідрогелю в процесі гіпотермічного зберігання протягом 24 або 48 годин на життєздатність і функціональну активність гепатоцитів щурів. Життєздатність знижувалася на 4 % і 13 % (24 години при 4 °C), 15 % і 33 % (48 годин при 4 °C) для інкапсульованих і суспензійних клітин, відповідно. Мітохондріальна, EROD і GST активності мали кращі показники в групі інкапсульованих клітин в порівнянні з суспензією. Було виявлено, що гіпотермічне зберігання індукує ранню каспаза-3-залежну активність, яка була завжди більш низькою у гепатоцитів, інкапсульованих у АМС. Таким чином, апоптоз у гепатоцитів, викликаний охолодженням, може бути в значній мірі попереджений шляхом інкапсуляції у АМС, що веде до поліпшення збереженості та функціональної активності клітин. У роботі Wright Vernice et all [193] був зроблений більш глибокий аналіз впливу концентрації альгінату, умов і терміну зберігання на життєздатність клітин з метою оцінити придатність альгінатного гідрогелю для зберігання епітеліальних клітин рогівки. Було продемонстровано, що 0,6 % (маса/об'єм) альгінатний гідрогель зберігає епітеліальні клітини рогівки більш ефективно за гіпотермічних (4 °C) і нормотермічних (37 °C) умов протягом 5 діб. Автори так само відзначили, що на збереження клітин, інкапсульованих у АМС, впливає як розмір пор, так і механічні властивості сформованого гідрогелю. Структурні характеристики альгінатного гідрогелю можуть коригуватися шляхом додавання і зміни співвідношення альгінату з пороутворюючими речовинами, наприклад, гідроксиетилкрохмалем. Всі ці дані свідчать про перспективність застосування альгінату при гіпотермічному зберіганні (4-8 °C).

В іншому дослідженні, однак, не вдалося підтвердити позитивну дію інкапсуляції при гіпотермічному зберіганні (4 °C) без використання

спеціалізованих добавок. Інкапсуляція в альгінатні-PLO мікросфери клітин печінки щурів лінії Buffalo (BRL) не надала поліпшення результатів по збереженню життєздатності та продукції метаболітів [194].

Слід мати на увазі, що велика частина позитивних результатів щодо перспективності застосування інкапсуляції при гіпотермічному зберіганні (4-8 °C) була отримана тільки для коротких проміжків часу. Можливо, більш тривале зберігання без застосування спеціалізованих середовищ або добавок буде мати негативний вплив на стан клітин, що вимагає виконання додаткових і більш глибоких досліджень в даній області.

На збереженість інкапсульованих клітин за позитивних температур зберігання можуть впливати і інші чинники. Так, Dontchoes Brian et all [195] були проведені дослідження з метою визначення, чи відбувається зниження життєздатності хондроцитів в процесі гіпотермічного зберігання (4 °C) при підвищенні рН, і чи дозволить насичення культурального середовища зберігання (DMEM) 5 % CO₂ стабілізувати рН, і таким чином підвищити життєздатність клітин. Після 5 діб зберігання при 4 °C некроз хондроцитів був виражений більшою мірою в середовищі, що не піддавалося насиченню CO₂, ніж в середовищі, насиченому 5 % CO₂. Ці дані демонструють, що підвищення рН середовища призводить до зниження збереженості хондроцитів в умовах гіпотермічного зберігання, а нормалізація цього параметра покращує результати зберігання.

Позитивна дія інкапсуляції в альгінат на переживання клітин може пояснюватися багатьма, до сьогоднішнього дня слабо вивченими, чинниками. Захисний ефект альгінатного гідрогелю може бути обумовлений як його прямим впливом, так і опосередковано. Імовірно, шляхом стабілізації плазматичної мембрани альгінатний гідрогель може викликати лігування інтегринів, що призводить до руйнування інтегрин-каспазного комплексу і таким чином забезпечує підвищення збереженості клітин, тим самим підтверджуючи вплив інкапсуляції в альгінатні мікросфери на регуляцію апоптозу [192]. Однак для підтвердження даної гіпотези необхідні додаткові дослідження, оскільки не всі

клітини схильні до інтегрин-залежної загибелі, а не всі інтегрини є апоптогенними. Опосередкований вплив альгінатного гідрогелю може бути наслідком його дифузних характеристик, які були визначені для молекул з різною масою [120, 196–199]. Так, відокремлене розташування клітин уповільнює вивільнення і дифузію протеолітичних ферментів від загиблих клітин до живих. Також, позитивний вплив альгінатного гідрогелю може бути наслідком зворотнього зниження загальної метаболічної активності і мітохондріального потенціалу клітин у складі АМС, як це було показано для фібробластів [200].

Таким чином, на підставі результатів численних досліджень можливо зробити припущення, що оптимальний вибір температурного режиму, середовища і фізико-хімічних параметрів альгінату можуть дозволити розробити технологічний підхід, який зможе значно подовжити ефективність короткострокового зберігання клітин для їхнього безпечного транспортування.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Виділення і моношарове культивування МСК

Дослідження проводились на мультипотентних мезенхімальних стромальних клітинах, одержаних з біоптатів заушної зони шкіри дорослих пацієнтів-волонтерів. Зразки тканин отримували за інформованої письмової згоди донорів відповідно до рекомендацій Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації з проведення біомедичних досліджень і відповідно до вимог біоетичного комітету ІПКіК НАН України. Для виділення МСК застосовували метод експлантації фрагментів [201, 202]. До даної роботи були залучені культури МСК, отримані раніше, які зберігалися в низькотемпературному банку ІПКіК НАН України за температури рідкого азоту до їхнього безпосереднього використання.

Розморожування зразків клітинних культур проводили за стандартною методикою [203–205] на водяній бані при 37°C з подальшим відмиванням ДМСО. Моношарове культивування клітин проводили в культуральному середовищі (КС) α -MEM (РАА, Австрія), доповненому 10 % ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби (РАА, Австрія), 2 мМ L-глутаміну, 50 од/мл пеніциліну і 50 мкг/мл стрептоміцину при 37 °С, 5 % CO₂ і 95 % вологості. Заміну культурального середовища проводили кожні 3-4 доби. Після досягнення клітинами 70-80 %-го конфлуента їх знімали з підложки за допомогою суміші трипсин (0,25 %)/версен (0,05 %), отриману суспензію центрифугували при 150 g протягом 7 хв, клітини ресуспендували в КС і пересівали в нові культуральні флакони площею 75 см² з щільністю посіву 5000 кл/см². Для досліджень використовували клітини 4-8-го пасажів.

Підрахунок кількості клітин при пересіві і виконанні експериментальних робіт проводили в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою [203]. Кількість клітин в 1 мл клітинної суспензії визначали за формулою:

$$C = \frac{N \times n}{4} \times 10^4 ,$$

де N - підрахована кількість клітин в 25 квадратах камери Горяєва, n - початковий об'єм клітинної суспензії.

2.2. Отримання АМС

У роботі використовували альгінат натрію (Sigma-Aldrich, США, A2158-250G), виділений з бурих водоростей, з високим вмістом маннуринової кислоти і низькою в'язкістю (250 сп при 22 °С). Сухий порошок альгінату натрію розчиняли в буфері Хенкса (рН 7,4) шляхом постійного перемішування з підігрівом. Для очищення від органічних домішок і токсичних компонентів в розчин вносили активоване вугілля, з розрахунку 0,5 г вугілля/1 г альгінатного порошку, суміш витримували при 4°С протягом доби. Після цього розчин фільтрували крізь целюлозну гігроскопічну медичну вату, задля видалення великих частинок вугілля, і серію фільтрів із різним розміром пор (0,65 → 0,45 → 0,22 мкм).

Гелюючим агентом слугував CaCl_2 . Розчин хлористого кальцію готували на фізіологічному буфері HEPES, що містив 0,15 М NaCl і 25 мМ HEPES (рН 7,4). Даний буфер також застосовувався як розчин для промивання. Перед використанням кожен розчин додатково проходив етап стерилізації шляхом фільтрації крізь нітроцелюлозний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

При підборі умов отримання однорідних АМС використовували різні за концентрацією розчини альгінату натрію (1,2; 1,5; 1,8; 2,0 %) та 2 %-й розчин хлористого кальцію. Візуальну оцінку отриманих АМС проводили за допомогою інвертованого мікроскопу CETI EpiFluor (CETI, Бельгія). Розмір і форму АМС оцінювали в програмі «AxioVision 4.8» («Carl Zeiss»).

Підбір фізичних параметрів, які впливають на розмір і форму одержуваних АМС, докладно описаний в розділі 3 власних досліджень, тому як переважно базується на технічних характеристиках пристрою, що застосовувався для отримання міфросфер за допомогою електророзпилення.

2.3. Інкапсуляція МСК у АМС

АМС з інкапсульованими у товщу гідрогелю клітинами одержували в такий же спосіб, як і безклітинні АМС, додаючи у вихідний розчин альгінату суспензію клітин [206]. Для цього клітини знімали з поверхні пластику, як описано вище, центрифугували при 150 g протягом 7 хв, промивали буфером HEPES, і суспендували в 1 мл очищеного 2 %-го альгінату натрію ($1,5 \times 10^6$ кл/мл). Альгінат натрію, що містив суспензію клітин, поміщали в стерильний шприц об'ємом 1 мл з діаметром голки 0,33 мм і розпилювали в 2 %-й розчин CaCl_2 , в якому залишали АМС на 10 хв для полімеризації. Після повної полімеризації проводили поступове відмивання АМС від надлишку іонів кальцію буфером HEPES. АМС з МСК інкубували в КС при 37 °С, 5 % CO_2 і 95 % вологості протягом ночі за для нормалізації клітинних функцій.

Рівномірне розпилення гелеутворювача з формуванням однорідних АМС (200 ± 20 мкм) забезпечувалося при дотриманні наступних параметрів: швидкість вивільнення розчину альгінату - 10 мл/год, висота розпилення - 4 см, прикладена напруга - ≤ 7 кВ, концентрація альгінату натрію - 2 %, концентрація хлористого кальцію - 2 %.

2.4. Розчинення АМС

В окремих експериментах для вивільнення клітин з гідрогелю здійснювали розчинення АМС. Для цього АМС з клітинами після промивання буфером HEPES інкубували у 50 мМ розчині цитрату натрію протягом 5 хв з інтенсивним піпетуванням. Отриману після розчинення АМС суспензію клітин двічі відмивали від шляхом центрифугування при 150 g протягом 7 хв, після чого ресуспендували клітинний осад в буфері HEPES або культуральному середовищі, в залежності від подальших цілей експерименту.

2.5. Отримання і заселення тривимірних носіїв на основі скелета губки *Ianthella basta*

З метою порівняння поведінки МСК у складі різних тривимірних носіїв, у якості моделі для порівняння був обраний скафолд на основі скелету морської губки *Ianthella basta*.

Для виділення хітинових зразків ліофілізовані скелети губки *Ianthella basta* піддавали обробці з використанням кислотного-лужного гідролізу [207, 208]. На першому етапі зразки поміщали в 20 %-й розчин оцтової кислоти на 12 год при 37 °С для розчинення кальцій-карбонатної складової губки і усунення частини білків і пігментів, після чого багаторазово промивали дистильованою водою. На другому етапі зразки обробляли 2,5 М NaOH протягом доби при 37 °С, що необхідно для видалення решти білків, мінералізованої складової і пігментів. Потім губки промивали дистильованою водою для досягнення рН 6,5 і повторювали цикл обробки до знебарвлення носіїв. На завершальному етапі очищення носії поміщали в 35 %-й розчин перекису водню на 15-20 хв при кімнатній температурі з подальшим відмиванням дистильованою водою. З демінералізованих зразків отримували носії розміром $\sim 3 \times 7 \times 0,4$ мм.

Попередню експансію МСК дерми людини проводили в середовищі культивування α -MEM («Sigma»), доповненої 10 % ЕС, 50 од/мл пеніциліну і 50 мг/мл стрептоміцину в CO₂-інкубаторі при 37 °С, 5 % CO₂ і 95 % вологості. Носії стерилізували в 70 %-му етиловому спирті, ретельно промивали розчином Хенкса і насичували культуральним середовищем. У ємність з неадгезивного пластику об'ємом 20 мл поміщали по 10 носіїв і суспензію клітин (2×10^6 в 10 мл), інкубацію їх здійснювали при 37 °С протягом 1 год на радіальному шейкері «MS1 Minishaker I KA» («Sigma») при 500 об/хв для забезпечення рівномірного заселення. Через 12 год заселені клітинами зразки губок переносили в лунки 24-луночного планшета, з 0,5 мл культурального середовища, і продовжували культивування в стандартних умовах до 7 діб.

2.6. Оцінка життєздатності клітин шляхом подвійного забарвлення ФДА і ЕБ

Життєздатність клітин у складі АМС оцінювали за допомогою комбінованого забарвлення флуоресцентними барвниками флуоресцеїндаацетатом (ФДА) і етідіумбромідом (ЕБ). Відомо, що ЕБ проникає тільки в клітини з пошкодженими плазматичними мембранами і високоспецифічно зв'язується з ДНК в клітинному ядрі. При зв'язуванні з ДНК ЕБ набуває здатності флуоресцювати в червоному світлі, в результаті чого ядра пошкоджених клітин візуалізуються. Одночасне забарвлення досліджуваних клітин ФДА дозволяє оцінити їхню життєздатність в тому ж полі зору за флуоресценцією, так як при експозиції клітин з ФДА барвник проникає всередину клітин і гідролітично перетворюється в флуоресцеїн, який накопичується всередині клітин з непошкодженими плазматическими мембранами.

Для визначення життєздатності інкапсульованих клітин АМС інкубували протягом 10 хвилин в буфері Хенкса, що містив ФДА (2 мкг/мл, Sigma-Aldrich) і ЕБ (4 мкг/мл, Sigma-Aldrich) як описано в роботах [209, 210]. Після інкубації мікросфери відмивали від барвників і досліджували на інвертованому мікроскопі СЕТІ з флуоресцентним модулем EpiFluor (СЕТІ, Бельгія).

2.7. Оцінка життєздатності та метаболічної активності МСК за МТТ тестом

МТТ-тест – це колориметричний тест, який дозволяє оцінювати життєздатність і метаболічну активність клітин. Розчинний у воді тетразолієвий барвник 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід (МТТ) легко проникає крізь мембрани живих клітин і відновлюється в пурпурний нерозчинний у воді формазаан. МТТ-тест проводиться на заключних етапах експериментів, тому як призводить до загибелі клітин. У відновленні МТТ, як і всіх тетразолієвих барвників, беруть участь НАД(Ф)Н/ФАДН-залежні оксидоредуктазні ферменти, локалізовані переважно в мітохондріях, а також цитозолі клітин, таким чином МТТ-тест є інтегральним показником клітинного метаболізму [211, 212]. Було показано, що МТТ та інші тетразолієві барвники відновлюються повільніше в клітинних лініях з низьким рівнем метаболізму, і навпаки, клітини, що швидко

діляться, показують високу ступінь відновлення МТТ [213, 214]. Таким чином відновлення МТТ безпосередньо залежить від кількості життєздатних клітин та їхньої метаболічної активності.

2.7.1. *Життєздатність* МСК оцінювали по їхній здатності відновлювати МТТ (Sigma-Aldrich, США) з прямим підрахунком кількості забарвлених клітин до і після впливу експериментальних чинників. Для цього клітини у вигляді суспензії або у складі АМС інкубували протягом 2 год в α -МЕМ, доповненій 10 % ЕС і 5 мг/мл МТТ, після чого, не відмиваючи, поміщали в камеру Горяєва, де підраховували загальну кількість клітин та кількість метаболічно активних клітин, що містили фіолетові гранули формагану (МТТ-позитивні клітини). Життєздатність клітин виражали у відсотках:

$$C = \frac{Ж}{К} \times 100\% ,$$

де С - життєздатність (у відсотках);

Ж - кількість (МТТ-позитивних) живих клітин;

К - загальна кількість клітин.

В разі визначення життєздатності клітин у складі АМС, мікросфери безпосередньо перед підрахунком в камері Горяєва розчиняли як описано вище.

2.7.2. *Метаболічну активність* МСК з використанням спектрофотометричного МТТ-тесту проводили відповідно до методики виробника (In vitro Toxicology Assay Kit, Sigma-Aldrich) [213]. До клітин у вигляді суспензії або у складі АМС вносили свіже КС доповнене 5 мг/мл МТТ Після інкубації протягом 2 год при 37°C рідку фазу видаляли, зразки кілька разів промивали безбарвним буфером Хенкса (у випадку АМС їх додатково розчиняли), після чого шляхом екстрагували внутрішньоклітинно утворений формаган внесенням 400 мкл 100 % ДМСО з подальшим інтенсивним перемішуванням. Абсорбцію отриманих розчинів оцінювали при 550 нм на спектрофлуориметрі Tecan GENios (Tecan inc., Австралія), обробку результатів проводили за допомогою програми XFLUOR4 v.4.50. Результати представляли в умовних одиницях абсорбції (УОА),

які визначалися як різниця між рівнями абсорбції дослідної і холостої (без клітин) проб.

2.8. Оцінка метаболічної і проліферативної активностей МСК за Alamar Blue-тестом

Прижиттєве визначення метаболічної і проліферативної активностей клітин в умовах культивування успішно здійснюється за допомогою редокс-індикатора Alamar Blue (AB, Serotec, США) [215–217]. Високо чутливий АВ-тест базується на здатності АВ легко проникати крізь біологічні мембрани і відновлюватися внутрішньоклітинними ферментами [218]. Накопичення відновленої форми АВ резаруфіну пропорційно активності редокс-ензимів і відображає, таким чином, загальний метаболічний стан та кількість клітин.

2.8.1. *Оцінка метаболічної активності.* Для постановки АВ-тесту клітини у вигляді моношару або складі АМС культивували в стандартних умовах протягом 1-24 годин, після чого культуральне середовище заміняли на свіже, доповнене 440 мкМ АВ (10 %-й розчин АВ). Паралельно середовище з АВ вносили в лунки планшета, що не містили клітин (холоста проба). Клітини культивували в присутності АВ протягом 1-2 годин при 37 °С і 95 % вологості в атмосфері з 5 % CO₂, після чого визначали рівень флуоресценції відновленої форми АВ в культуральному середовищі на спектрофлуориметрі Tecan GENios (Tecan inc.) при хвилі збудження 550 нм і хвилі емісії 590 нм. Обробку даних проводили за допомогою програми XFLUOR4 v.4.50. Результати виражали в умовних одиницях флуоресценції (УОФ) – різниця між рівнями флуоресценції дослідної і холостої проб – або у відносних одиницях флуоресценції (ВОФ). Розрахунок ВОФ виконували згідно протоколу виробника за формулою:

$$\text{ВОФ} = \frac{S_x - S_b}{S_b},$$

де S_x - значення флуоресценції дослідної проби;

S_b - значення флуоресценції холостої проби (10 %-й розчин АВ в КС без клітин).

2.8.2. *Оцінка проліферативної активності МСК.* Визначення приросту відновленої форми АВ в культурі за сталих умов Для непрямой оцінки проліферативної активності при культивуванні у вигляді моношару або складі АМС клітини поміщали в описані вище стандартні умовах культивування, після чого крізь 24 год оцінювали рівень флуоресценції АВ на 1-у добу культивування. Потім АВ видаляли, а клітини у вигляді моношару або складі АМС культивували протягом 5 діб. На 5-у добу культивування, проводили інкубацію зразків з 10 % АВ і оцінювали рівень його флуоресценції, як було описано раніше. Отримані результати відносили до показників тих же зразків на 1-у добу культивування. При цьому вважали, що достовірне підвищення рівня відновленості АВ відображає збільшення кількості клітин і, отже, їх проліферацію.

2.9. Оцінка здатності клітин прикріплятися до культурального пластику

До однієї з основних властивосте МСК, що є ключовою для їх нормального функціонування, належить адгезія. Для кількісної оцінки даної властивості в лунки 24-луночного культурального планшета вносили суспензію клітин з щільністю посіву 5000 кл/см² в середовищі α -МЕМ, доповненого 10 % ЕС, і культивували протягом 1 доби. Після 1 доби відбирали усе культуральне середовище і підраховували в ньому кількість не прикріплених клітин. Таким чином, кількість прикріплених до культурального пластику клітин розраховували за формулою:

$$E = \frac{A - B}{A} \times 100 \%,$$

де: А - кількість клітин до посіву;

В - кількість не прикріплених клітин після 1 доби культивування.

2.10. Оцінка мембранного потенціалу мітохондрій МСК з використанням барвника JC-1

Величину мембранного потенціалу мітохондрій ($\Delta\psi_m$) можна оцінити цитофлуориметрично за допомогою ліпофільного катіонного індикатора 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетілбензімідазолкарбоціанін йодиду (JC-1). При наявності $\Delta\psi_m$ молекули JC-1 проходять всередину органели, де в її матриксі або на самій внутрішній мембрані акумулюються в достатній кількості. При низькій концентрації барвника, внаслідок низького $\Delta\psi_m$, молекули барвника знаходяться в формі мономерів і флуоресціюють в зеленій області. Підвищення $\Delta\psi_m$ (вище 140 мВ) приводить до підвищення концентрації барвника, наслідком чого є реорганізація молекул барвника в димери, що формують J-агрегати, які флуоресціюють в червоно-оранжевій області [219]. Таким чином, клітини з високим $\Delta\psi_m$ легко відрізнити за наявністю червоно-оранжевої флуоресценції, а по співвідношенню інтенсивності червоно-оранжевого і зеленого світіння можна судити про величину мембранного потенціалу мітохондрій.

Для оцінки $\Delta\psi_m$ МСК у складі АМС або у вигляді моношару використовували флуоресцентний індикатор JC-1 (НТК «Інститут монокристалів», Харків, Україна) відповідно до інструкції комерційних аналогів для спектрофлуориметричного і флуоромікроскопічного аналізів [219]. До МСК у складі АМС або у вигляді моношару вносили флуоресцентний індикатор JC-1 в розрахунку 10 мкг/мл КС, після чого клітини культивували протягом 30 хв при 37 °С в стандартних умовах.

Якісну оцінку забарвлення клітин у складі АМС або у вигляді моношару проводили за допомогою конфокального скануючого мікроскопа з аргонним лазером (робоча потужність 5,4 мВт) Carl Zeiss Meta LSM 510 за стандартною методикою для конфокальної мікроскопії та програмного забезпечення LSM 510 ver. 4.2 (Carl Zeiss, Німеччина). Зображення отримували при довжині хвилі збудження 488/560 нм з використанням об'єктива EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27 і фільтра HTF 405/488/543/633 в трьох каналах: у першому реєстрували емісію в діапазоні 518-540 нм, у другому - емісію в діапазоні 561-593 нм, в третьому - видиме зображення в прохідному світлі. Величина лазерної апертури (pinhole)

становила 288 мкм. Отримані зображення обробляли в програмі Zeiss LSM Image Examiner ver. 4.2.0.121.

Кількісну оцінку даного показника проводили шляхом аналізу інтенсивності флуоресценції JC-1 на планшетному спектрофлуориметрі «Tecan GENios» при довжині хвилі збудження 560 нм і довжині хвилі емісії 595 нм для оцінки червоно-оранжевого світіння, яке свідчить про високий мембранний потенціал на внутрішній мембрані мітохондрій. Для оцінки низького мембранного потенціалу визначали інтенсивність флуоресценції JC-1 при довжині хвилі збудження 485 нм і довжині хвилі емісії 535 нм. Результати виражали у ВОФ, розрахунок яких виконували за формулою, що наведена вище для АВ-тесту.

2.11. Спрямоване остеогенне диференціювання МСК

2.11.1. *Індукція остеогенного диференціювання.* Для виявлення здатності МСК до спрямованого остеогенного диференціювання в умовах моношарового культивування їх переводили в середовище α -MEM, що містило 10 % ЕС і індуктори остеогенезу: 100 нМ дексаметазону (Sigma-Aldrich), 10 мМ β -гліцерофосфату (Sigma-Aldrich), 0,2 мМ L-аскорбінової кислоти-2-фосфату (Sigma-Aldrich) [22, 220]. Клітини культивували в даному середовищі протягом 21 доби. Заміну середовища проводили 2 рази на тиждень. Після культивування культури клітин фіксували 10 % забуференим формаліном протягом 30 хв при 4 °С. Для аналізу спонтанного диференціювання клітини в контрольних лунках культивували в середовищі α -MEM з 10 % ЕС без індукторів, з подальшою їх фіксацією як описано вище.

2.11.2. *Індикація остеогенного диференціювання за мінералізацією позаклітинного матриксу.* Накопичення позаклітинного кальцію впродовж остеогенного диференціювання МСК оцінювали морфологічно шляхом забарвлення барвником Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) [221]. Для цього фіксовані препарати культур МСК інкубували 2 хв в 1 %-му розчині барвника Alizarin Red S за кімнатної температури, потім промивали дистильованою водою. Морфологічні

дослідження забарвлених препаратів здійснювали за допомогою світлового інвертованого мікроскопа CETI Inverso (CETI, Бельгія).

2.12. Спрямоване адіпогенне диференціювання МСК

2.12.1. *Індукція адіпогенного диференціювання.* Для оцінки здатності клітин до спрямованого адіпогенного диференціювання МСК у вигляді моношару переводили в середовище α -MEM, що містило 10 % ЕС і індуктори адіпогенезу: 0,5 мМ 3-ізобутіл-1-метил-ксантину (Sigma-Aldrich), 1 мкМ дексаметазону (Sigma-Aldrich), 10 мкг/мл інсуліну (Sigma-Aldrich), 100 мкМ індометацину (Sigma-Aldrich) [220, 222]. Культивування в даному середовищі для адіпогенного диференціювання проводилося протягом 21 доби, заміну культурального середовища проводили 2 рази на тиждень. Паралельно до експериментальних зразків проводили контроль на спонтанне диференціювання. Усі зразки культур фіксували 10 % забуференим формаліном протягом 30 хв при 4 °С.

2.12.2. *Індикація адіпогенного диференціювання.* Виявлення нейтральних ліпідів шляхом забарвлення Oil Red O використовувалося для підтвердження адіпогенного диференціювання, в результаті якого в МСК накопичувалися жирові вакуолі. Фіксовані препарати культур промивали дистильованою водою, обробляли 60 % ізопропанолом (Макрохім, Росія) і поміщали в свіжоприготований розчин Oil Red O (Sigma-Aldrich) (30 мг/мл в 60 % ізопропанолі) на 1 годину за кімнатної температури, після чого промивали дистильованою водою [223]. Окрашені зразки досліджували за допомогою світлового інвертованого мікроскопа CETI Inverso (CETI).

2.13. Оцінка осмотичної реакції МСК на 1 М розчин ДМСО

Визначення транспортних характеристик МСК проводили методом волюмометрії, сопоставляючи експериментально отримані залежності об'єму клітин від часу їх контакту з 1 М розчином ДМСО, що містив ізотонічну концентрацію хлористого натрію, з рішеннями теоретичної моделі [224]. Відносний об'єм клітини $V(t)/V_0$ (де $V(t)$ - об'єм клітини у момент часу t , V_0 –

початковий об'єм клітини) визначали шляхом вимірювання діаметрів зображень клітин, отриманих за допомогою мікроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss). Діаметр (d) клітин вимірювали, використовуючи програму AxioVision 4.8 (Carl Zeiss).

При контакті клітини з розчином проникаючої речовини (кріопротектора) зміну її об'єму V і концентрацій, розчинених поза і всередині її речовин за часом, описує система диференціальних рівнянь:

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} V = SL_p [\sigma_1 (\pi_1^{in} - \pi_1^{out}) + \pi_2^{in} - \pi_2^{out} - \Delta_p] \\ \frac{d}{dt} \pi_1^{in} = - \left[SK_1 (\pi_1^{in} - \pi_1^{out}) - \sigma_1 \pi_1^{in} \frac{dV}{dt} \right] \frac{1}{V - \alpha V_0} \\ \pi_1^{in} = \pi_{20}^{in} \frac{1 - \alpha}{(V/V_0 - \alpha)} \end{cases} \quad (1)$$

де t – час, π_1^{out} та π_1^{in} – осмотичний тиск проникаючої крізь плазматичну мембрану речовини поза і всередині клітини, π_2^{out} та π_2^{in} – сумарний осмотичний тиск непроникаючої крізь плазматичну мембрану речовини поза і всередині клітини, Δ_p – перепад гідростатичного тиску на клітинній мембрані, S та L_p – площа поверхні і коефіцієнт фільтрації мембрани, K_1 та σ_1 – коефіцієнт проникності і коефіцієнт відбиття плазматичної мембрани для проникаючої крізь мембрану речовини, π_{20}^{in} та V_0 – початкове значення сумарного осмотичного тиску непроникаючих речовин всередині клітини і її початковий об'єм, α – об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин (для МСК $\alpha = 0,367$).

Перехід до безрозмірних величин призводить рівняння (1) до вигляду:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[\sigma_1 (\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) + \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} - 1 \right] \\ \frac{d\hat{\pi}_1^{out}}{dt} = - \frac{1}{\tau_1} \left[(\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) + \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} \frac{dy}{dt} \right] \frac{1}{y - \alpha} \\ \hat{\pi}_2^{in} = \hat{\pi}_2^{in}(0) \left(\frac{1 - \alpha}{y - \alpha} \right) \end{cases} \quad (2)$$

де $y = \frac{V}{V_0}$; $\tau_0 = \frac{1}{L_p \gamma \hat{\pi}_0^{in}}$; $\tau_1 = \frac{1}{K_1 \gamma}$; $\pi_0^{in} = 7,8$ атм. – осмотичний тиск ізотонічного розчину, $\hat{\pi}_{1,2}^{in,out} = \pi_{1,2}^{in,out} / \pi_{20}^{in}$ – наведений осмотичний тиск проникаючого (1) і

непроникаючого (2) компонента всередині і поза клітиною, γ – поверхнево-об'ємне відношення клітини.

$$\gamma = \frac{S_0}{V_0} = \frac{4\pi r^2}{\frac{4}{3}\pi r^3} = \frac{3}{r} = \frac{6}{d}$$

де d – початковий діаметр клітини, що вимірюється експериментально. Коефіцієнт відбиття клітинної мембрани σ_1 у всіх розрахунках приймали рівним 0,95. Розрахунок коефіцієнтів проникності мембран клітин виконували, вирішуючи диференціальні рівняння (2). Варіюючи параметри τ_0 та τ_1 , визначали значення L_p та K_1 , намагаючись досягти збігу теоретичних кривих до експериментальних даних.

Використана у даній роботі фізико-математична модель також досить коректно описує осмотичну поведінку клітин на етапі заморожування. Рішеннями моделі при відомих значеннях L_p та K_1 є залежності $y(T)$, $\pi_1^{in}(T)$ та $\pi_2^{in}(T)$ від температури. Такі рішення нескладно отримати для лінійних режимів охолодження.

Зміна коефіцієнтів фільтрації і проникності плазматичної мембрани для розчиненої речовини підпорядковується арреніусовим залежностям:

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[\frac{E_{\alpha_0}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right]$$

$$K(T) = K(T) \exp \left[\frac{E_{\alpha_1}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right]$$

де T_0 – вихідна температура клітинної суспензії у градусах Кельвіна, E_{α_0} та E_{α_1} – енергії активації процесу перенесення крізь плазматичну мембрану молекул води і розчиненої речовини відповідно, R_0 – універсальна газова стала (8,314 кДж/моль·град).

Прогнозування осмотичної поведінки клітин при заморожуванні з різними швидкостями здійснювали, підставляючи в рівняння моделі знайдені значення L_p і

К₁. Виходячи з літературних даних для різних типів клітин брали середні значення E_{α_0} (20 – 40 кДж/моль), E_{α_1} (60 – 90 кДж/моль).

Перехід до нових змінних проводився в такий спосіб:

$$\frac{dy}{dt} \cdot \frac{dT}{dT} = \frac{dy}{d\hat{T}} \cdot \beta, \quad \beta = \frac{dT}{dt}$$

де β – швидкість охолодження.

Система диференціальних рівнянь, що описує кінетику зміни відносного об'єму клітини і концентрацію проникаючої крізь плазматичну мембрану речовини всередину клітини в процесі позаклітинної кристалізації, має вигляд:

$$\frac{dy}{d\hat{T}} = p \exp\left(a \frac{(\hat{T}-1)}{\hat{T}}\right) \left\{ \sigma_1 \hat{n}_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \left[1 + \sigma_1 \frac{\hat{n}_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{n}_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \hat{n}_2^{out} \right\} \quad (3)$$

$$\frac{d\hat{n}_1^{in}}{d\hat{T}} = \frac{p}{y-\alpha} \left\{ \left[\sigma_1 \hat{n}_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - (1 + \sigma_1 \Phi_{out}) \hat{n}_2^{out} \right] \times [(1 - \sigma_1) \hat{n}_{1\infty} - \hat{n}_1^{in}] \times \exp\left(a \frac{(\hat{T}-1)}{\hat{T}}\right) - q(\hat{n}_1^{in} - \Phi_{out} \hat{n}_2^{out}) \exp\left(b \frac{(\hat{T}-1)}{\hat{T}}\right) \right\}$$

де $\Phi_{out} = \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{n}_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\hat{n}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}$, $\hat{n}_2^{out} = \frac{\hat{n}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}{1-yg_0-x(1-\alpha g_0)}$, $p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}$, $q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}$,

$a \equiv \frac{E_{\alpha_0}}{R_0 T_0}$, $b \equiv \frac{E_{\alpha_1}}{R_0 T_0}$, g_0 – початкове значення відношення сумарного об'єму клітин до повного об'єму системи.

Кінетику зміни концентрації (С) позаклітинного розчину в процесі заморожування при розрахунках задавали аналітично шляхом апроксимації фазової діаграми плавлення водного розчину для ДМСО у наступному вигляді:

$$c = -0,00055 \times T^3 - 0,06348 \times T^2 - 2,78524 \times T;$$

де T – поточна температура.

Із системи рівнянь (3) для певних транспортних характеристик клітин і обраних швидкостей охолодження була отримана залежність об'єму клітин від температури заморожування. З огляду на ступінь дегідратації, можна зробити припущення про можливість або неможливість внутрішньоклітинної кристалізації у МСК при даному режимі охолодження.

2.14. Кріоконсервування МСК

У якості кріозахисного середовища використовували культуральне середовище α -МЕМ, що містило 10 % ЕС і ДМСО в кінцевій концентрації 1 М (7,5 %). Культуральне середовище з подвійною концентрацією ДМСО і ЕС повільно по краплях додавали в рівний об'єм культурального середовища, що містило суспензію або інкапсульовані у АМС МСК (кінцева концентрація 1×10^5 кл/мл). Зразки еквілібрували протягом 15 хв за температури 4 °С і заморожували у кріопробірках (NUNC, США) об'ємом 1 мл. Охолодження зразків проводили за допомогою програмного заморожувача УОП-6 (СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України) при швидкостях охолодження 0,5, 1, 10 і 20 °С/хв до досягнення температури -40 °С, з подальшим їх зануренням у рідкий азот (-196 °С).

Після зберігання протягом 1-2-х діб, зразки відігрівали на водяній бані при 37 °С і видаляли кріопротектор шляхом повільного розведення деконсервованих суспензій культуральним середовищем з 10 % ЕС в співвідношенні 1:10. Суспензію клітин центрифугували при 150 g протягом 7 хв, до осаду додавали свіже культуральне середовище і визначали життєздатність клітин за допомогою МТТ тесту шляхом прямого підрахунку, як описано вище.

2.15. Зберігання МСК за позитивних температур

МСК у вигляді суспензії або у складі АМС для зберігання поміщали в кріопробірки об'ємом 2 мл з напівкруглим дном (NUNC). Доза клітин, внесених в одну кріопробірку як у вигляді суспензії, так і інкапсульованих у АМС, становила близько 100 000, загальний об'єм - 1 мл. Герметично закриті кріопробірки із зразками витримували за температур 4, 22 і 37 °С протягом 1, 2 або 3 діб у вертикальному положенні. У якості середовища зберігання використовували культуральне середовище α -МЕМ, доповнене 10 % ЕС. На кожен термін спостереження проводили візуальну оцінку стану експериментального матеріалу в кріопробірках. Для оцінки збереженості МСК визначали життєздатність клітин після відмивання від середовища зберігання і вивільнення з АМС, а також клітинну адгезію, метаболічну активність та здатність до індукованого диференціювання після поміщення їх в умови культивування, як описано вище. В

якості контролю використовували МСК в суспензії і інкапсульовані у АМС, що не піддавалися зберіганню (нульова точка зберігання).

Для гіпотермічного зберігання МСК, замість культурального середовища до МСК у вигляді суспензії або у складі АМС вносили сахарозо-сольовий розчин (ССР; Таблиця 2.1) або розчин Університете Вісконсіна (UW; Таблиця 2.1). Після чого МСК у вигляді суспензії або у складі АМС поміщали в кріопробірки як описано вище. Герметично закриті кріопробірки з досліджуваними зразками поміщали в побутовий холодильник (4 °С) для гіпотермічного зберігання протягом 3 і 7 діб. На 3-й і 7-у добу гіпотермічного зберігання АМС розчиняли, отриману суспензію відмивали буфером HEPES і розводили в 1 мл культурального середовища. Клітини, що зберігалися у вигляді суспензії, так само відмивали від консервуючих розчинів аналогічним чином. У якості контролю були використані МСК, що знаходилися у вигляді суспензії або інкапсульовані у АМС, до гіпотермічного зберігання (нульова точка зберігання) і клітини, які зберігалися в культуральному середовищі.

Таблиця 2.1. Склад розчинів, що використовувалися для гіпотермічного зберігання МСК у вигляді суспензії та у складі АМС

| Компоненти розчинів | Концентрації компонентів у розчинах, мМ | | |
|----------------------------------|--|-----|-----|
| | α -MEM (основні компоненти) | UW | ССР |
| NaCl | 116,3 | — | — |
| KOH | — | 105 | — |
| NaOH | — | 4 | — |
| KH ₂ PO ₄ | — | 2,6 | 30 |
| MgSO ₄ | 0,8 | 10 | 1 |
| Na ₂ HPO ₄ | 1 | — | 15 |
| CaCl ₂ | 1,8 | — | 0,5 |

| | | | |
|----------------------|-----|-----|-----|
| Лактобіонова кислота | — | 108 | — |
| L-Глутамін | 2 | — | — |
| D-Глюкоза | 5,5 | — | — |
| Рафіноза | — | 31 | — |
| Сахароза | — | — | 250 |
| ПЭГ-8000 | — | — | 1 % |
| pH | 7,4 | 7,4 | 7,4 |

2.16. Методи статистичної обробки даних

Отримані результати обробляли статистично за допомогою програм «Excel» (Microsoft, США) і «Past Statistic v/3/01» (Швеція). Залежно від характеру розподілу даних, значимість відмінностей між показниками оцінювали використовуючи параметричний t-критерій Стюдента або непараметричний критерій Манна-Уїтні. Відмінності між вибірками вважали значущими при $p \leq 0,05$.

2.17. Використані реактиви

Фірма виробник і країна виробництва використаних в роботі реактивів наведено в тексті розділу при першій згадці. Решта реактивів вітчизняного виробництва мали марку «хч» або «охч».

РОЗДІЛ 3. ОТРИМАННЯ АЛЬГІНАТНИХ МІКРОСФЕР ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ЕЛЕКТРОРОЗПИЛЕННЯ ТА ВЛАСТИВОСТІ ІНКАПСУЛЬОВАНИХ В НИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН

Технологія інкапсуляції клітин у АМС забезпечує ефективну їхню іммобілізацію всередині товщі напівпроникної полімерної матриці, яка не обмежує двобічної дифузії молекул кисню та вуглекислого газу, поживних речовин, факторів росту і т.п., але перешкоджає проникненню в товщу капсули речовин з молекулярною масою понад 100 кДа та інших клітин. Прийом інкапсуляції широко застосовується у різних галузях діяльності людини: в області захисту навколишнього середовища, аграрній, харчовій, фармацевтичній промисловостях, косметології, медицині [225]. Успішне задіяння інкапсульованих клітин можливе лише в разі відповідності отриманих АМС, що містять кітини, ряду певних вимог, серед яких правильна сферична форма, однорідність мікросфер за розміром і формою, забезпечення збереженості життєздатності клітин.

3.1. Отримання АМС із застосуванням електророзпилення

3.1.1. Система для формування гідрогелевих мікросфер із застосуванням електророзпилення.

На сьогоднішній день найбільш поширеним методом формування гідрогелевих мікросфер є так званий крапельний метод, при якому гель утворюється внаслідок дифузії гелюючого агента всередину крапель гелеутворювача при їх внесенні у ємність з гелюючим агентом без використання додаткового обладнання. Форма та розмір отриманих мікросфер великою мірою залежать від способу формування крапель гелеутворювача. Найбільш перспективним на тепер вважається застосування з цією метою методу електророзпилення (електроспрей) [188], який передбачає використання генератора високої напруги. При цьому, є актуальним застосування

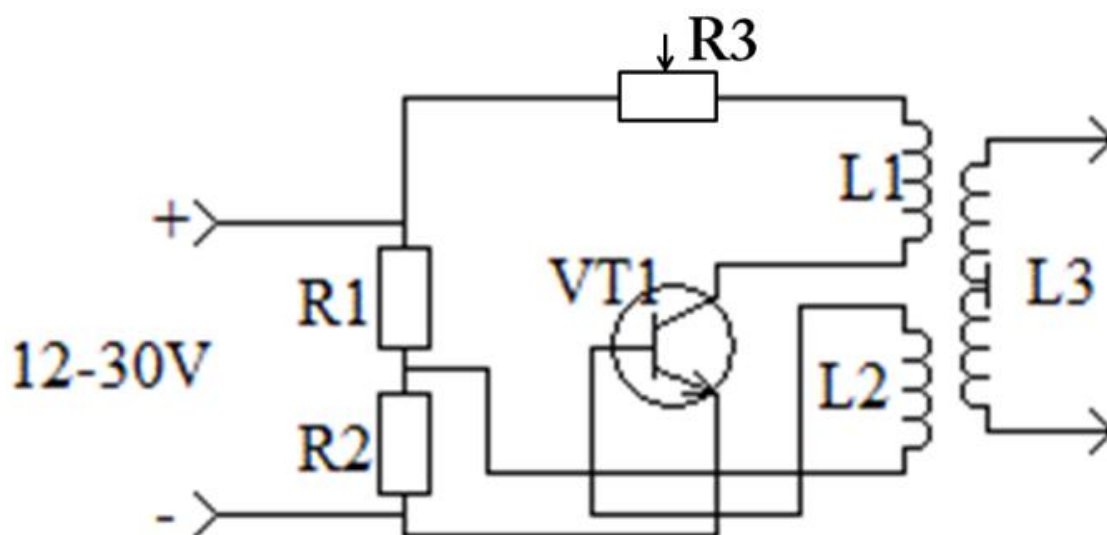


Рис. 3.1. Узагальнююча електрична схема приладу, для генерації високої напруги. Примітка: R1, R2 – резистори 220 та 22 Ом; R3 – потенціометр 2 кОм; VT1 – біполярний низькочастотний n-p-n транзистор MJE13009; L1 – обмотка зворотнього зв'язку; L2 – первинна обмотка; L3 – вторична обмотка.

генератора високої напруги, який би забезпечив можливість регулювання напруги та отримання мікросфер рівномірного розміру та форми для відтворюваності одержаних результатів.

Задля реалізації методу в роботі використовувався генератор з функцією регульованої подачі напруги від 0 до ≤ 7 кВ. Основою пристрою був потужний біполярний низькочастотний n-p-n транзистор моделі MJE13009 (рис 3.1). Два резистори R1 і R2 (220 Ом і 22 Ом) визначали вихідну потужність, задаючи струм транзистора. Високовольтним трансформатором слугував строчний трансформатор з феритовим стрижнем. Первинна обмотка містила 15 витків, а обмотка зворотного зв'язку - 8 витків. Як джерело живлення використовувався двонапівперіодний випрямляч із знижуючим трансформатором, що забезпечує напругу 12 В з силою струму 3 А. Введення в схему потенціометра (R3, 2 кОм) забезпечувало регулювання напруги в ланцюзі, що надає змогу в свою чергу регулювати кінцеву напругу для розпилення рідини.

При подачі живлення до позитивного і негативного полюсів струм проходить крізь резистори і обмотку зворотного зв'язку до бази транзистора MJE13009. Даний потік вмикає транзистор, і струм починає протікати крізь

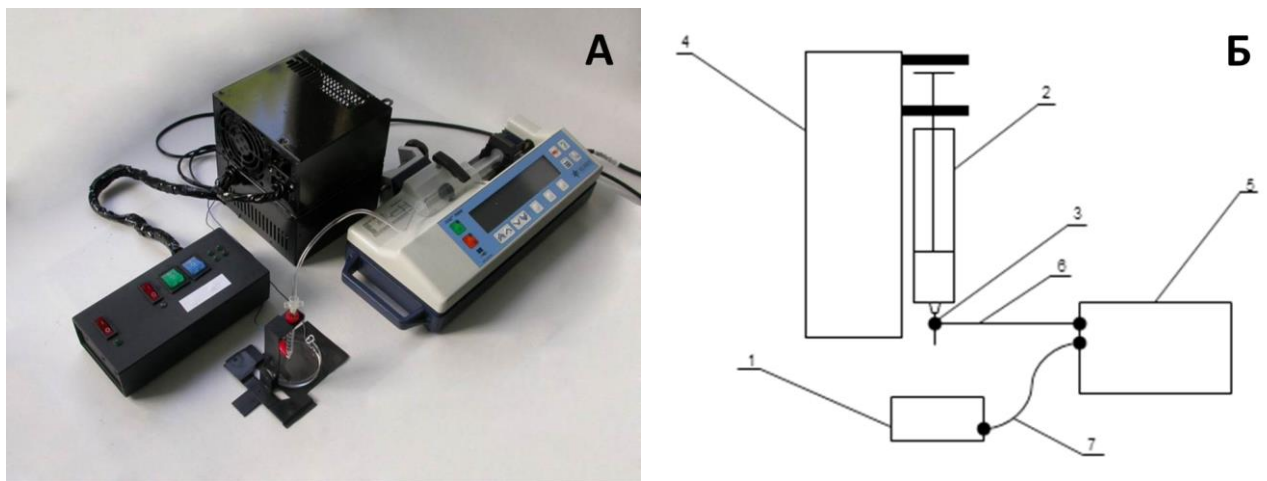


Рис. 3.2. Система для отримання гідрогелевих мікросфер із застосуванням електророзпилення. А - Загальний вигляд; Б – схематичне зображення, де: 1 – ємність з гелюючим розчином; 2 - шприц; 3 - тупокінцева голка; 4 - шприцевий інфузійний насос; 5 - генератор високої напруги; 6 - позитивний контакт для подання напруги на голку шприца; 7 - негативний контакт, що розміщується у резервуарі з гелюючим розчином.

первинну обмотку трансформатора. У вторинній обмотці трансформатора відбувається підвищення напруги і створюється магнітне поле. У той же час на обмотці зворотного зв'язку, протилежній за полярністю базовому потоку, формується інша менша напруга, що призводить до вимкнення транзистора. Вимкнення транзистора має результатом зниження напруги на вторинній обмотці і падіння магнітного поля. Відновлення нормального потоку струму до бази транзистора приводить до його повторного включення і запускання наступного циклу. Дані цикли повторюються зі своєю природною частотою. За рахунок цього, схема є саморегульованою і частота циклів встановлюється на оптимальному значенні в залежності від навантаження.

Система для отримання гідрогелевих мікросфер фіксованого розміру із застосуванням методу електророзпилення в цілому відповідала типовій схемі [10, 188] і в нашому випадку включала шприцевий інфузійний насос, шприц об'ємом 1 мл з тупокінцевою голкою діаметром 0,33 мм, ємність для гелюючого розчину і описаний вище генератор високої напруги (рис.3.2).

Шприцевий інфузійний насос та шприц закріплювалися в вертикальному положенні. Нижче голки шприца, на заданій висоті, встановлювався резервуар з гелюючим розчином. На голці шприца фіксувався позитивний контакт генератора для подання високої напруги, а негативний контакт поміщався у ємність для гелюючого розчину. Одночасне рівномірне вивільнення розчину гелеутворювача зі шприца і формування електростатичного потенціалу між голкою і ємністю з гелюючим розчином забезпечувало рівномірне розпилення гелеутворювача і подальше формування однорідних за розміром мікросфер.

Регулювання подання напруги дозволяє контролювати процес розпилення гелеутворювача і, відповідно, розмір одержуваних гелевих мікросфер. Застосування даної системи мінімізує вплив дослідника на процес формування мікросфер і забезпечує отримання певного відтворюваного результату. Важливо, що поверхні кожного елемента такої системи перед застосуванням легко піддаються знезараженню за допомогою ультрафіолетового випромінювання (лампа БУВ-30, експозиція 15 хв).

3.1.2. Процедура отримання АМС

Альгінат є найбільш поширеним матеріалом для отримання гідрогелевих мікросфер. Він являє собою лінійний полісахарид природного походження, що складається із залишків β -D-мануронової (M) і α -L-гулурунової (G) кислот, які формують GG/GM/MM блоки різної довжини. Отримані з різних джерел альгінати варіюють за відсотковим вмістом кожної з кислот і співвідношенням M/G блоків. Ключовою особливістю всіх альгінатів є здатність формувати пористий гідрогель шляхом поперечного зв'язування залишків α -L-гулурунової кислоти за допомогою бівалентних катіонів (таких як Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}). Процес гелеутворення альгінату може відбуватися за фізіологічних умов, альгінат не чинить негативного впливу на клітини [10] і це робить його найбільш зручним матеріалом для отримання мікросфер з розташованими всередині них клітинами.

У даній роботі використовували розчин альгіната натрію (Sigma-Aldrich, США, A2158-250G), виділеного з бурих водоростей, з високим вмістом

конуса розпилення не відбувалось, а лише збільшувалася частота відриву крапель. Поступове збільшення напруги, що подається на кінчик голки, приводило до формування правильного конуса розпилення і зменшення розміру мікросфер. При цьому діаметр одержуваних мікросфер безпосередньо корелював з силою напруги, поданої на кінчик голки. Застосований у роботі генератор високої напруги дозволяв отримувати однорідні мікросфери з мінімальним діаметром 200 мкм.

Вважається, що оптимальним для АМС є діаметр 200-400 мкм [100, 105]. Такий діаметр забезпечує максимально ефективний розподіл речовин, без помітного негативного впливу на клітини. Збільшення розміру мікросфер понад 400-500 мкм перешкоджає вільній дифузії кисню і поживних речовин. Використаний в даній роботі генератор високої напруги дозволив отримати АМС оптимального діаметру і, крім того, регулювати цей параметр у вузькому діапазоні.

Основною силою, від якої залежить ефективність розпилення альгілату в даній системі, є не сама подана напруга, а створений за рахунок цієї напруги електростатичний потенціал, який можна регулювати, змінюючи відстань від кінчика голки до поверхні гелюючого розчину. Дійсно, збільшення відстані при максимальній напрузі з 4 см до 6 см приводило до збільшення діаметра одержуваних АМС від 500 до близько 1500 мкм. Конус розпилення при цьому ставав менш сформованим. Зменшення відстані до 2 см призводило до утворення менших за розміром мікросфер, проте вони мали спотворену пласку або напівсферичну форму. До того ж відзначалась поява ще однієї, дрібнішої, фракції мікросфер діаметром близько 20 мкм.

Одним із параметрів процесу отримання мікросфер, який можна варіювати, є швидкість вивільнення альгілату зі шприца. Застосований в роботі 2 %-й розчин альгілату натрію є досить в'язким розчином (~ 250 сп при 25 °С), максимальна швидкість вивільнення його зі шприца визначається внутрішнім діаметром голки, крізь яку він проходить. Використання голки з внутрішнім діаметром 0,33 мм обмежує швидкість вивільнення 2 %-го розчину альгілату 10 мл/год. Було

встановлено, що інтервал часу, за який відбувається електророзпилення і завершується гелеутворення за швидкості вивільнення альгілату 10 мл/год, не перевищує 15 хв. Діаметр отриманих АМС при цьому складає близько 400 мкм за максимальної напруги. Зниження швидкості вивільнення альгілату зі шприца до 5 мл/год не впливає на діаметр одержуваних АМС. Подальше зниження швидкості вивільнення альгілату призводить до утворення ще однієї фракції мікросфер, менших за розміром.

Діаметр використаної голки, безперечно, впливає на розмір крапель альгілату, а, отже, і на діаметр одержуваних мікросфер, але при формуванні крапель альгілату за допомогою електророзпилення і утворення електростатичного потенціалу цей вплив нівелюється. Експериментально було підтверджено, що внутрішній діаметр голки в нашій системі не впливає істотно на розмір одержуваних АМС, а лише визначає максимально можливу швидкість вивільнення альгілату зі шприца. Слід зазначити, що великі швидкості вивільнення альгілату з шприца можуть негативно впливати на правильне вертикальне спрямування конусу розпилення. Крім того, встановлено, що для формування правильного, орієнтованого в напрямку падіння крапель конуса розпилення кращими є тупокінцеві голки. Застосування усічених голок призводить до викривлення конуса розпилення, в результаті чого формуються неоднорідні за формою і розміром мікросфери.

Було встановлено, що основним параметром, який визначає форму одержуваних із застосуванням електророзпилення АМС, є концентрація розчинів альгілату натрію і хлористого кальцію, гелеутворювача і гелюючого агента. Використання 1,2 %-го альгілату натрію і 2 %-го хлористого кальцію призводило до формування АМС неправильної сферичної форми з шорсткою поверхнею (рис. 3.4.). Підвищення концентрації альгілату натрію приводило до отримання більш однорідних за формою гладких мікросфер. Найбільш стабільні мікросфери, які характеризувалися правильною сферичною формою і гладкою поверхнею, були отримані при використанні 1,8-2,0 %-х розчинів альгілату натрію. Крім того, при використанні розчинів альгілату натрію концентрацією 1,5-2,0 % утворювалися

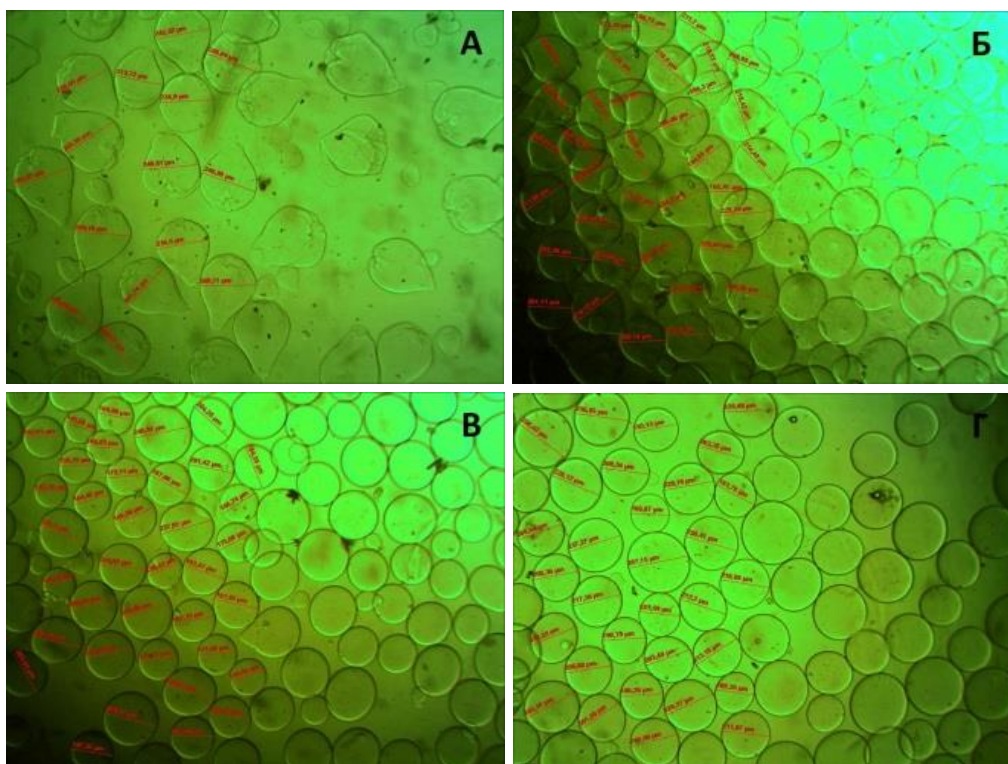


Рис. 3.4. AMC, отримані при взаємодії різних за концентрацією розчинів альгінату натрію (1,2 % (А), 1,5 % (Б), 1,8 % (В), 2,0 % (Г)) з 2 % розчином хлористого кальцію. Світлова мікроскопія, $\times 100$.

більш щільні і менші за розміром мікросфери, ніж при використанні 1,2 %-го альгінату натрію. Ці результати узгоджуються із принципом зовнішнього іонотропного формування альгінатного гідрогелю [94] а також із залежністю розміру пор отриманого гелю від концентрації застосованого альгінату [226].

Таким чином, у роботі були визначені ключові параметри, від яких залежать розмір і форма одержуваних із застосуванням електророзпилення AMC. Встановлено, що найбільш істотний вплив на розмір мікросфер чинить прикладена напруга, в той час як форма AMC залежить більшою мірою від концентрацій речовин, що взаємодіють. Експериментально були встановлені значення параметрів, які дозволяють отримувати однорідні сферичні AMC заданого розміру за допомогою обраної системи, а саме: прикладена напруга - ≈ 7 кВ; відстань від кінчика голки до поверхні гелюючого розчину - 4 см; швидкість вивільнення альгінату зі шприца - 10 мл/годину; внутрішній діаметр голки - 0,33

мм; форма голки - тупокінцева; концентрація розчину альгілату натрію - 2 %; концентрація розчину хлористого кальцію - 2 %.

3.2. Властивості МСК у складі АМС, отриманих із застосуванням електророзпилення

3.2.1. Морфологія і життєздатність МСК у складі АМС

АМС з інкапсульованими у товщу гідрогелевих матриць-мікросфер клітинами одержують в такий же спосіб, як і безклітинні АМС, додаючи у вихідний розчин альгілату суспензію клітин. Тобто клітини піддаються усім чинникам гелеутворення в обраній системі отримання гідрогелевих мікросфер. Як зазначалося раніше, гелювання альгілату відбувається за фізіологічних умов, тому процедура отримання АМС, в якій краплі формуються гравітаційно, очікувано не впливає на життєздатність та властивості інкапсульованих клітин. Також відомо, що застосування прийому розпилення розчину альгілату за допомогою газового потоку не чинить істотного негативного впливу на властивості інкапсульованих МСК [10]. При застосуванні прийому електророзпилення для формування АМС з МСК клітини зазнають впливу додаткових чинників. Це зумовлює необхідність дослідження життєздатності клітин та їхніх властивостей після процедури інкапсуляції.

МСК визначені як популяція фібробластоподібних клітин, які в умовах моношарового культивування прикріплюються до адгезивної поверхні і розпластуються на ній, набуваючи веретеноподібної форми [47]. При переведенні МСК в суспензію або при створенні спеціальних умов, які не дозволяють клітинам прикріплюватися до підложки, вони набувають сферичної форми.

При взаємодії альгілату з хлористим кальцієм формується прозорий гідрогель, який дозволяє стежити за клітинами безпосередньо всередині самих АМС. В наших експериментах після повної полімеризації альгілатного гідрогелю спостерігались МСК сферичної форми, рівномірно розташовані по всьому об'єму

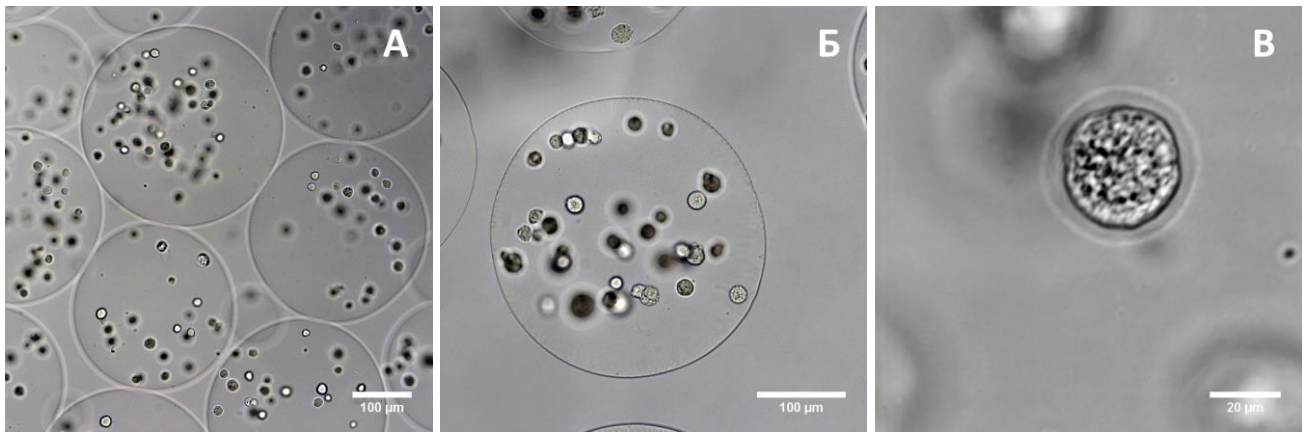


Рис. 3.5. МСК, інкапсульовані в АМС, 1 доба культивування *in vitro*. Прижиттєва світлова мікроскопія.

АМС (рис. 3.5.). Клітини не формували кластерів, тобто кожна клітина була відокремлена від інших товщею альгінатного гідрогелю.

Слід окремо звернути увагу на рівномірний розподіл клітин по всьому об'єму АМС, який забезпечили обрані нами умови отримання АМС, хоча за гіпотезою Віенаїме і співавт. [227] по периферії мікросфери повинна спостерігатися більша концентрація клітин, особливо в разі збільшення концентрації альгінату, за рахунок руху альгінатних ланцюгів до периферії під час процесу гелеутворення.

Класичним методом експрес-оцінки життєздатності клітин є прижиттєве забарвлення трипановим синім. Даний метод, загальноживаний для клітинних суспензій, виявився непридатним для тестування клітин у складі АМС внаслідок викривлень, зумовлених офарбленням альгінатного гідрогелю та перекриванням оптичних шарів при світловому мікроскопіюванні.

Більш прийнятним методом оцінки життєздатності клітин, що знаходяться у складі АМС, є комбіноване забарвлення флуоресцентними барвниками ФДА та ЕБ в поєднанні з наступною конфокальною скануючою лазерною мікроскопією. Ці речовини не офарблюють альгінатний гідрогель і дозволяють оцінити стан клітин, не порушуючи цілісності АМС. Як було з'ясовано, майже всі клітини у складі АМС, отриманих із застосуванням електророзпилення, демонструють зелену флуоресценцію, що свідчить про їхню життєздатність (рис. 3.6.).

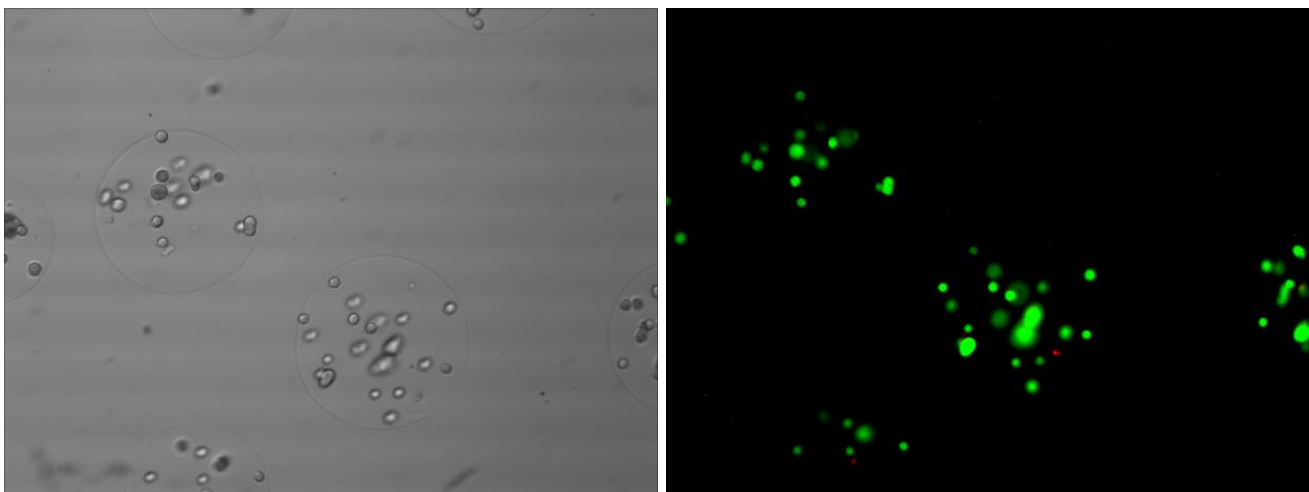


Рис. 3.6. Життєздатність МСК у складі АМС, забарвлення ФДА/ЕБ. Конфокальна скануюча лазерна мікроскопія, $\times 100$.

Методом, що дозволяє оцінити і життєздатність, і метаболічний стан клітин, є МТТ-тест. Принцип даного тесту ґрунтується на здатності живих клітин відновлювати тетраразолієву сіль МТТ у нерозчинний у воді формазан. Утворений формазан накопичується всередині клітин, що дозволяє уникнути офарблення альгінатного гідрогеля і змін його оптичних властивостей (рис. 3.7.). Початкова, до інкапсуляції у АМС, життєздатність МСК, оцінена за допомогою МТТ-тесту, становила 96 ± 2 %. Інкапсуляція МСК у АМС шляхом електророзпилення практично не впливала на цю характеристику клітин – 94 ± 3 %.

Культивування МСК у складі АМС протягом 7 діб не призводило до змін їхньої морфології та до істотного зниження життєздатності, яка становила наприкінці терміну спостереження близько 90 %.

Отримані результати щодо морфології і життєздатності МСК у складі АМС, дозволяють зробити висновок, що опрацьовані в даній роботі умови отримання мікросфер за допомогою електророзпилення не спричиняють суттєвих негативних змін щодо досліджуваних характеристик МСК протягом, щонайменше, семи діб культивування.

3.2.2. Вплив інкапсуляції в АМС на метаболічний стан МСК



Рис. 3.7. МСК у складі АМС, МТТ-тест. Світлова мікроскопія.

В дослідженнях, проведених раніше на МСК в АМС, отриманих за допомогою газового потоку [10], було показано, що інкапсульовані клітини при культивуванні у складі мікросфер здатні підтримувати свою життєздатність на високому рівні досить тривалий час – не менше 21 доби. Весь цей час МСК залишалися округлими і кількість їх не збільшувалася. Було з'ясовано, що це інгібування проліферації є оборотним, і після розчинення АМС і повернення клітин до умов моношарової культури, вони здатні адгезувати до культурального пластику і проліферувати.

Це спонукало нас до більш глибокого дослідження метаболічного стану клітин, що перебувають в товщі альгінатного гідрогеля у складі мікросфер. Задля цього проводили оцінку здатності інкапсульованих клітин відновлювати редокс-індикатори Alamar Blue та МТТ в порівнянні зі спроможністю МСК, що знаходяться в умовах моношарової культури. Результати вимірювань флуоресценції Alamar Blue з інтервалом в 5 хв протягом 1 год культивування показали (рис. 3.8.), що динаміка відновлення АВ клітинами у моношарі і у складі АМС має подібний характер: протягом перших 20 хв рівень флуоресценції збільшується експоненціально, а потім – лінійно. Однак рівень відновленої форми

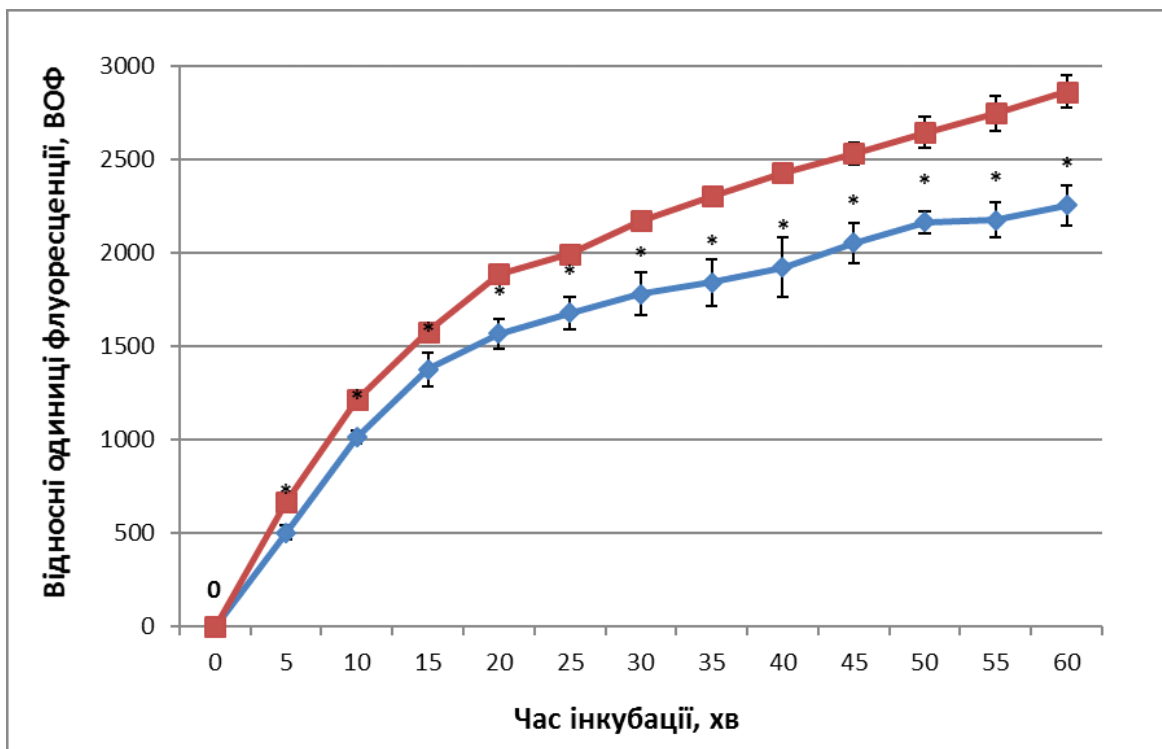


Рис. 3.8. Динаміка відновлення Alamar Blue при короткостроковому культивуванні МСК у вигляді моношару (■) і складі АМС (◆).

Примітка: * - Відмінності значущі у порівнянні з моношаровою культурою, $p \leq 0,05$.

АВ достовірно нижчий при культивуванні МСК у складі АМС в порівнянні з МСК в моношарі. Так, вже після перших 5 хв культивування у вигляді моношару МСК відновлювали АВ до значень $668 \pm 10,2$ ВОФ, тоді як клітини у складі АМС забезпечували на 24,5 % менший рівень відновленого АВ. В перебігу подальшого культивування різниця в накопиченні відновленої форми АВ у відсотковому вираженні істотно не змінювалась і становила на 60-й хвилині 24 %.

З рис.3.9, А видно, що рівень відновлення МТТ за 2 год культивування МСК у складі АМС становив лише $0,439 \pm 0,011$ УОА, що є на 32 % нижчим за показник, отриманий при культивуванні МСК у вигляді моношару ($0,645 \pm 0,023$ УОА). Після культивування клітин у складі АМС протягом 2 год у присутності АВ (рис. 3.9, Б) рівень накопичення його відновленої форми був на 28,3 % нижчим, ніж при культивуванні МСК в моношарі (інтенсивність флуоресценції становила $2530,6 \pm 151,7$ ВОФ і 3531 ± 96 ВОФ, відповідно). Таким чином, два

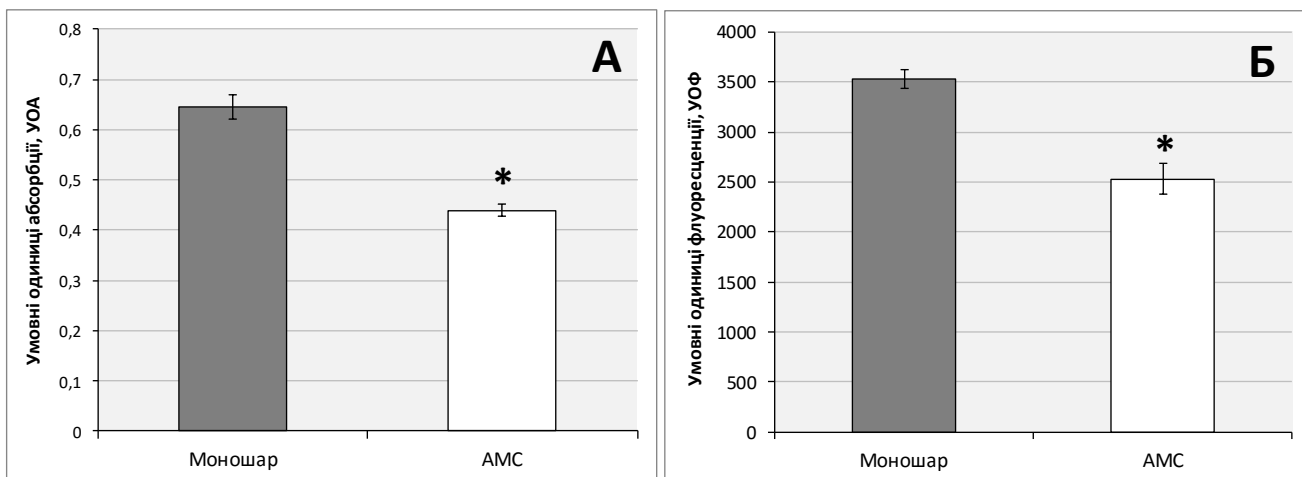


Рис. 3.9. Ступінь відновлення редокс-індикаторів МТТ (А) і Alamar Blue (Б) після 2 год культивування клітин у вигляді моношару і в складі АМС.

Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з моно шаром.

незалежні методи показали, що метаболічна активність МСК у складі АМС приблизно на 30 % нижча за рівень метаболічної активності клітин в моношарі.

З огляду на те, що ферменти, які беруть участь у метаболізмі МТТ і АВ, головним чином локалізовані в мітохондріях, було доцільно дослідити вплив інкапсуляції в АМС на мембранний потенціал мітохондрій ($\Delta\psi_m$) МСК. Величину $\Delta\psi_m$ можна оцінити за допомогою катіонного флуоресцентного барвника JC-1, який за низьких значень $\Delta\psi_m$ присутній у формі мономерів і флуоресцює в зеленій області спектра, а при високих значеннях $\Delta\psi_m$ формує J-агрегати, що мають флуоресценцію в червоно-оранжевій області. Таким чином, клітини з високим $\Delta\psi_m$ легко відрізнити за наявністю червоно-оранжевої флуоресценції, а по співвідношенню інтенсивності флуоресценції в червоно-оранжевій і зеленій областях спектру можна оцінити величину мембранного потенціалу мітохондрій.

На представлених мікрофотографіях видно, що в моношарі розпластані МСК характеризуються слабким монотонним світінням в зеленій області спектра (рис.3.10, А-Г). Картина флуоресценції в червоно-оранжевій області свідчить про велику кількість скупчень J-агрегатів. На суміщеному зображенні видно, що популяція клітин у моношарі гетерогенна: в одних клітинах JC-1 присутній

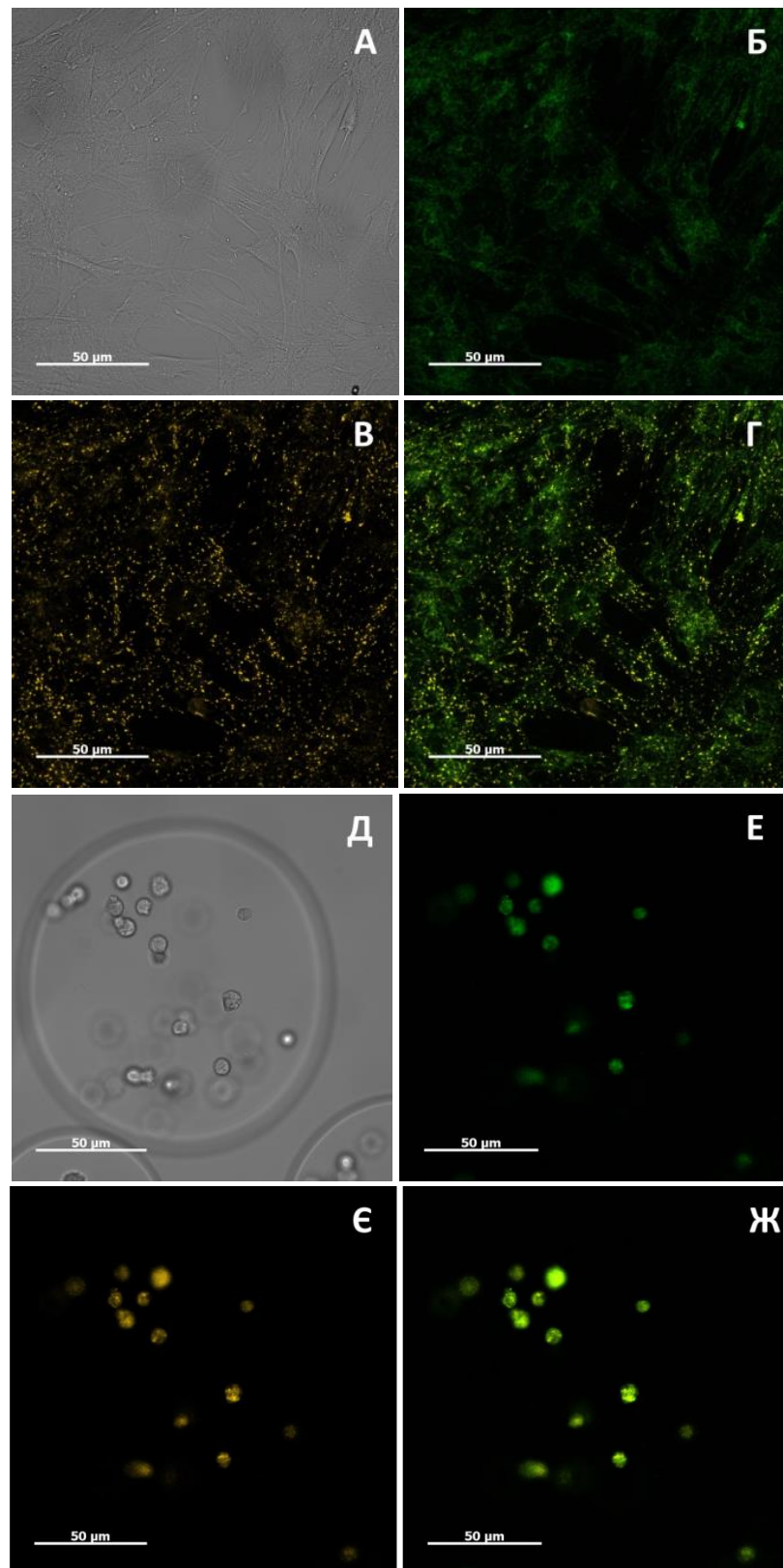


Рис. 3.10. Мікрофотографії моношару (А-Г) та інкапсульованих у АМС (Д-Ж) МСК, забарвлених JC-1.

Примітка: А, Д – світлова мікроскопія; Б, Е – флуоресценція $\lambda = 535$ нм; В, Є – флуоресценція $\lambda = 595$ нм; Г, Ж – суміщена мікрофотографія флуоресценції $\lambda = 535/595$ нм.

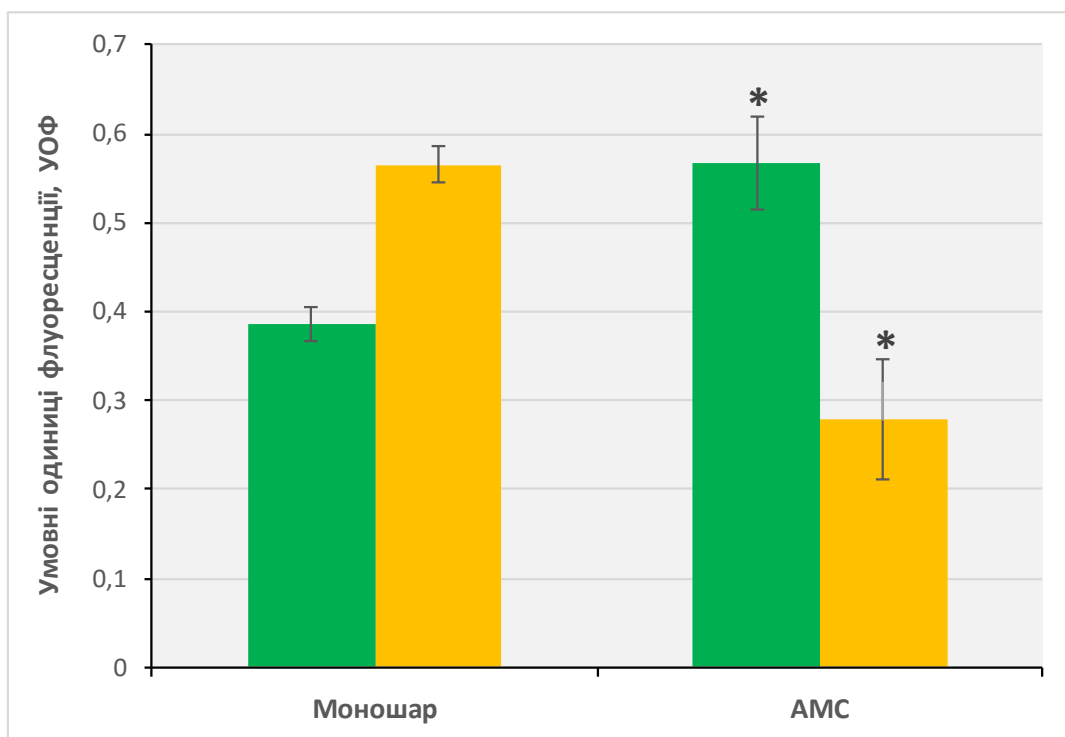


Рис. 3.11. Інтенсивність флуоресценції JC-1 в МСК, що культивовані у вигляді моношару або у складі АМС, при $\lambda = 535$ нм (■; низький мембранний потенціал) і $\lambda = 595$ нм (■; високий мембранний потенціал).

Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з моношаром при однакових довжинах хвиль.

більшою мірою у вигляді J-агрегатів, а в інших – у вигляді мономерів. У складі АМС (рис.3.10 Д-Ж) клітини сферичної форми рівномірно флуоресціюють в зеленій і червоно-оранжевій областях, причому флуоресценція в зеленій області значно більш виражена, ніж в разі клітин у моношарі.

Мікроскопічне дослідження не дозволяє кількісно оцінити відмінності $\Delta\psi_m$ у МСК, що культивуються у вигляді моношару або у складі АМС, оскільки клітини мають різну форму і просторове розташування. У зв'язку з цим вплив інкапсуляції МСК у АМС на інтенсивність флуоресценції JC-1 визначали також спектрофлуориметричним методом. МСК у моношарі проявляли високу інтенсивність флуоресценції в червоно-оранжевій області спектра ($\lambda = 595$ нм) – $0,564 \pm 0,020$ ВОФ, в зеленій області ($\lambda = 535$ нм) інтенсивність флуоресценції становила $0,387 \pm 0,019$ ВОФ (рис. 3.11). МСК у складі АМС демонстрували

протилежну картину: в зеленій області визначали $0,566 \pm 0,051$ ВОФ, що на 46 % вище, ніж в моношаровій культурі, а в червоно-оранжевій області – $0,277 \pm 0,067$ ВОФ – вдвічі менше, ніж у моношарі. Тобто, для моношарової культури переважним є світіння J-агрегатів, що свідчить про високий мембранний потенціал більшості клітин, в той час як для клітин у складі АМС більш характерний низький мембранний потенціал.

Таким чином, культивування МСК у складі мікросфер розміром близько 200 мкм, які утворені із 2 %-го розчину альгінату під дією 2 %-го хлористого кальцію із залучення електророзпилення, супроводжується зниженням загальної метаболічної активності клітин, дослідженої за допомогою за МТТ- та Alamar Blue-тестів, та зниженням мембранного потенціалу мітохондрій, порівняно з клітинами у моношаровій культурі. При цьому клітини в АМС перебувають у неадгезивному стані, не мають міжклітинних контактів, не спроможні проліферувати, однак здатні тривалий час підтримувати свою життєздатність на високому рівні. Ми поставили перед собою задачу з'ясувати оборотність змін структурно-метаболічного стану клітин після повернення їх до умов моношарового культивування на адгезивному пластиці, як раніше це було показано для арешту проліферації МСК в АМС, отриманих за допомогою газового потоку [10].

3.2.3. Функціональна активність МСК після вивільнення з АМС

Однією з переваг альгінатного гідрогелю як матеріалу для інкапсуляції клітин у мікросфері є можливість його розчинення в присутності хелатуючих агентів і вивільнення клітин. Це надає можливість дослідити сталість змін метаболічного стану клітин, що були виявлені після інкапсуляції.

Після розчинення АМС і переведення МСК в умови моношарового культивування 85 ± 4 % клітин були здатні прикріплюватися до культурального пластику, вони вступали у стадію активної проліферації і на третю добу культивування МСК формували суцільний рівномірний моношар. (рис.3.12).

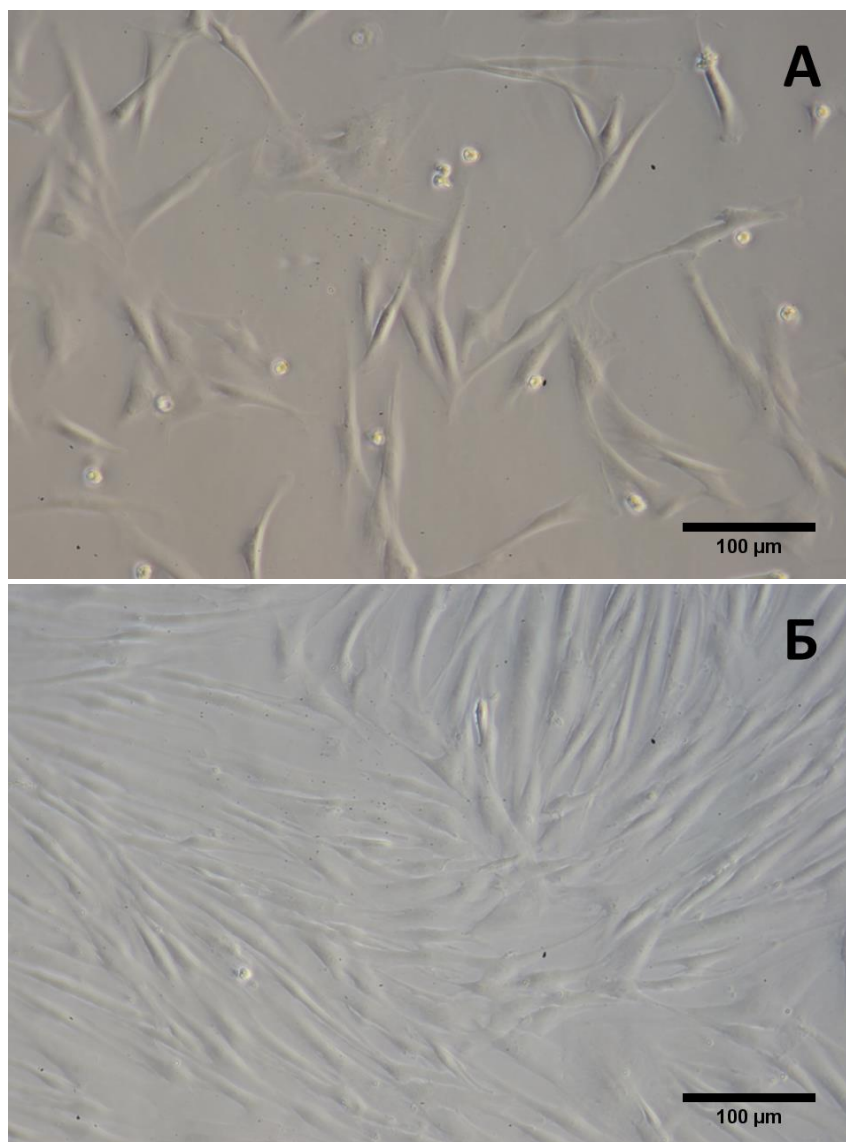


Рис. 3.12. Культура МСК, вивільнених з АМС і переведених в умови моношарового культивування, на 1-у (А) і 3-у (Б) добу після посіву. Прижиттєва світлова мікроскопія.

Про відновлення як проліферативної, так і метаболічної активності після вивільнення з АМС свідчило збільшення інтенсивності флуоресценції відновленої форми Alamar Blue в перебігу культивування: після першої доби моношарового культивування клітини, що попередньо були інкапсульовані у АМС, відновлювали АВ до значення $1531,72 \pm 160,30$ УОФ, на 7-му добу цей показник зростав вчетверо до $5765,68 \pm 122,39$ УОФ (рис. 3.13). Таку ж саму динаміку виявляли і контрольні культури клітин, що не піддавалися інкапсуляції:

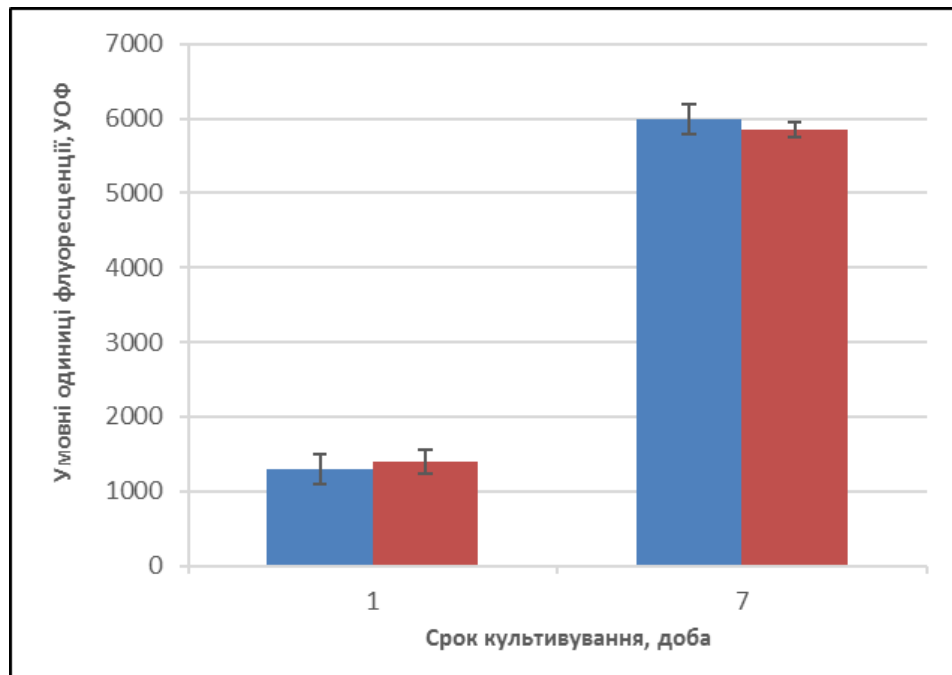


Рис. 3.13. Відновлення Alamar Blue при моношаровому культивуванні контрольних культур МСК, що не піддавалися інкапсуляції (■), та культур клітин після інкапсуляції та вивільнення з АМС (■).

1396,40±186,56 УОФ на першу добу та 5978,33±199,85 УОФ на 7-му добу культивування.

Як було зазначено вище, інкапсуляція клітин в АМС призводить до зворотнього блокування їх проліферації, збереженню клітинами сферичної форми і зниження метаболічної активності, однак при використанні модельної тривимірної конструкторії на основі скелета морської губки *Ianthella basta* не було відзначено подібних впливів. Так, клітини, заселені в носії, прикріплялися до стінок і розпластувалися на них, набуваючи фібробластоподібної морфології. Через 7 днів культивування спостерігалось поступове заповнення пор носія клітинами від периферії до центру (рис. 3.14). При цьому, культивування клітин на тривимірній матриці протягом 7 днів супроводжувалося активною їх проліферацією, без помітного блокування метаболічної активності, про що свідчить збільшення показника АВ після 7 днів культивування (рис. 3.15).

Таким чином, демінералізовані носії зі скелетів морської губки *Ianthella basta*, що є біосумісним матеріалом, забезпечують активний ріст МСК, що

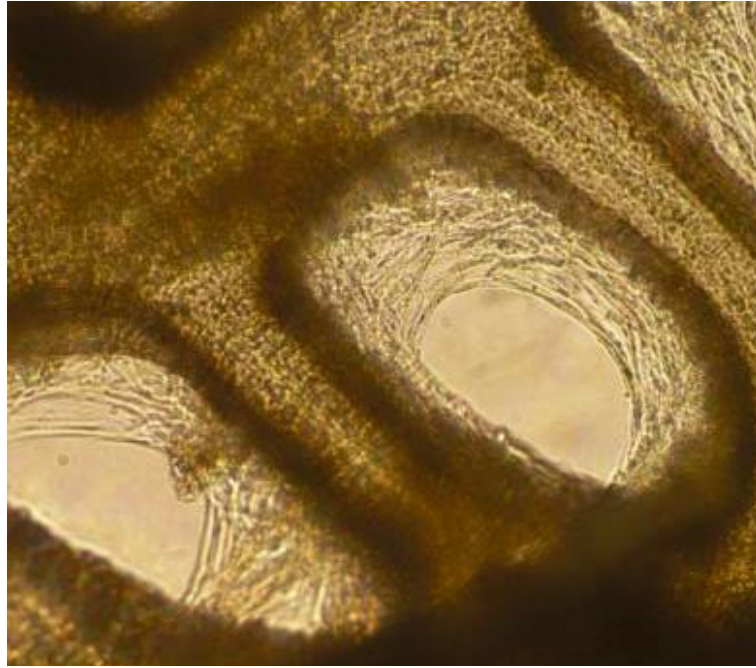


Рис. 3.14. МСК, після 7 діб культивування на скелетах морської губки *Ianthella basta*. Світлова мікроскопія, $\times 250$.

заповнюють пори, без помітного блокування проліферації та зниження метаболічної активності. При цьому, клітини характеризувалися

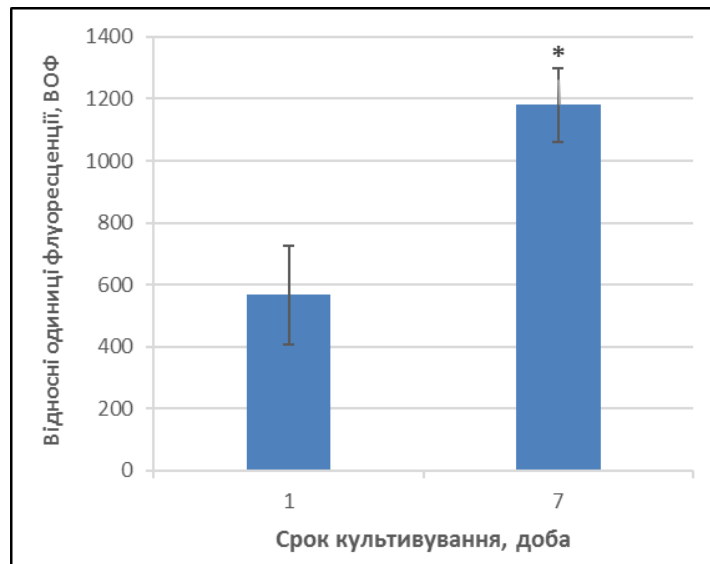


Рис. 3.15. Відновлення Alamar Blue при культивуванні культур МСК на носіях *Ianthella basta* на 1-шу та 7-му добу.

Примітка: * - Відмінності значущі в порівнянні до 1-ї доби культивування, $p \leq 0,05$.

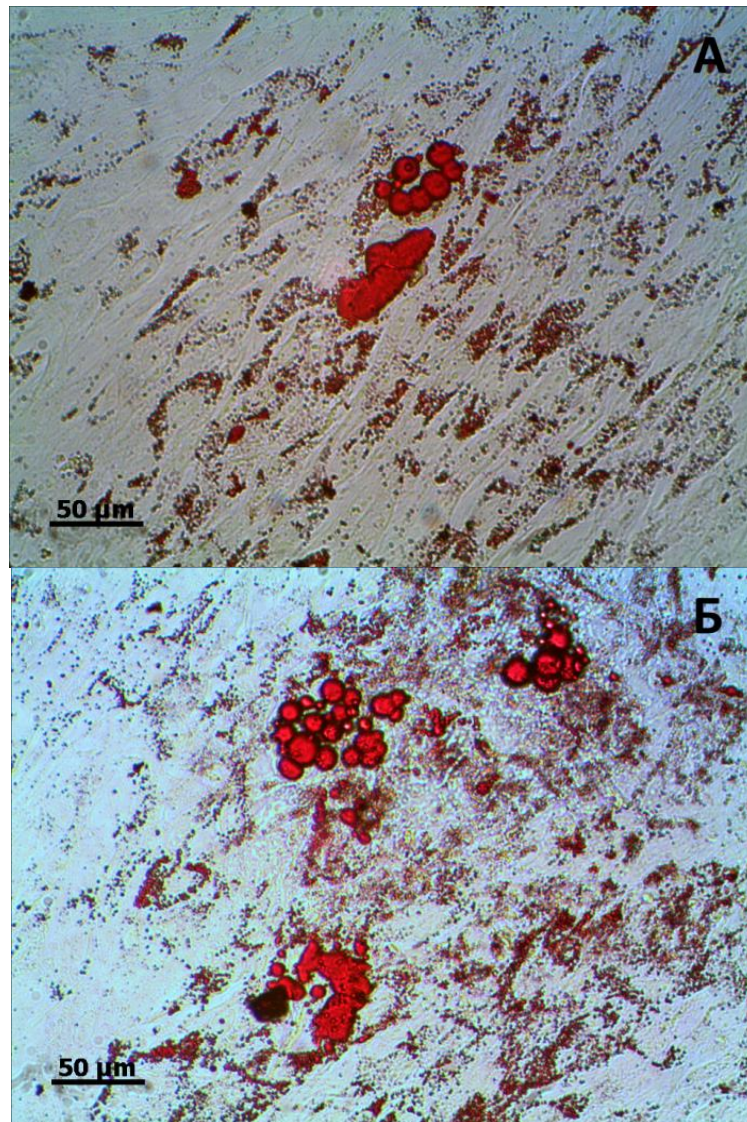


Рис. 3.16. Індикація вступу МСК, що не були піддані інкапсуляції (А) та після вилучення їх з АМС (Б), до індукованого адипогенного диференціювання. Забарвлення Oil Red O.

фібробластоподібних морфологією після заселення. У зв'язку з цим, можна зробити висновок, що на поведінку клітин в АМС впливає як сам альгінат (відсутність сайтів адгезії), а так само просторове формувати альгінатного гідрогелю навколо сферичних клітки.

Таким чином, зміни стану МСК після інкапсуляції в АМС із застосуванням електророзпилення (арешт проліферації, зниження метаболічної активності) мають оборотний характер і відновлюються після повернення у стандартні умови моношарового культивування.

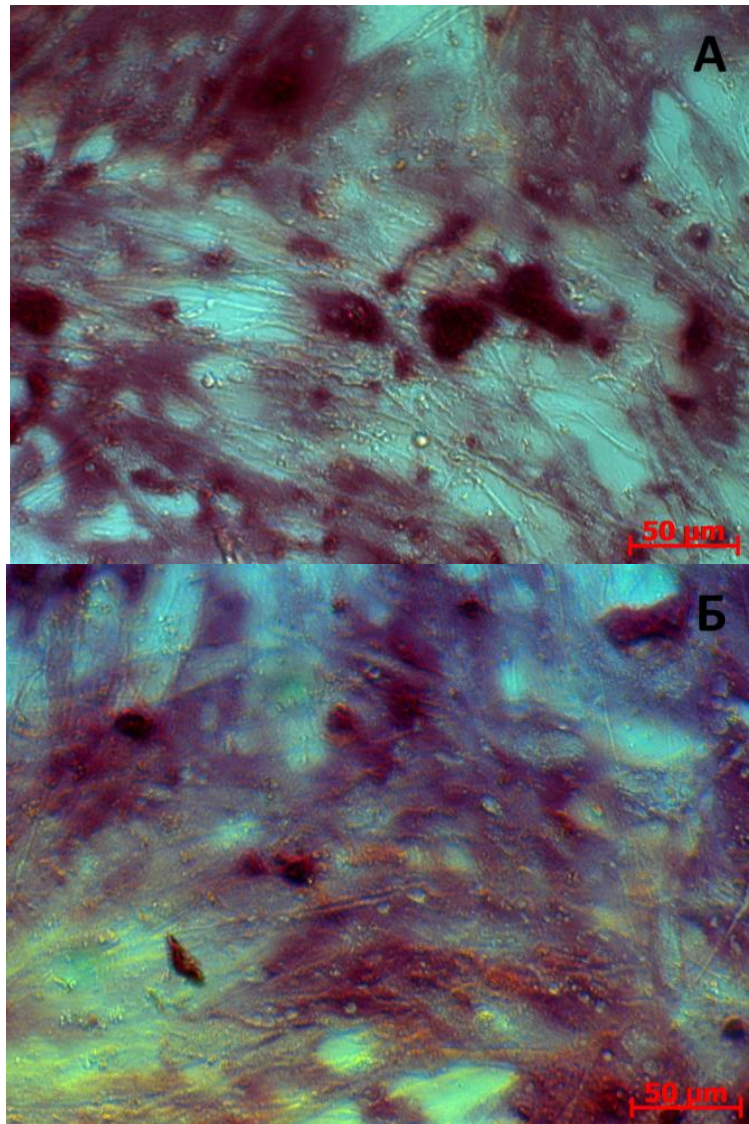


Рис. 3.17. Індикація вступу МСК, що не були піддані інкапсуляції (А) та МСК після вилучення з АМС (Б), до індукованого остеогенного диференціювання. Забарвлення Alizarin Red S.

Відмінною властивістю МСК є їхня здатність до індукованого мультилінійного диференціювання. Умови інкапсуляції в АМС та подальшого вивільнення МСК з них можуть бути визнані відповідними тільки у тому випадку, якщо підтверджена наявність цієї здатності. Для цього МСК після вилучення з АМС і переведення в умови моношарового культивування піддавали дії індукторів диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямках. Як видно з рис. 3.16, клітини в перебігу культивування в адипогенному середовищі набували округлу форму і

накопичували внутрішньоклітинні ліпіди у вигляді характерних крапель, що забарвлювалися барвником Oil Red O в рожево-червоний колір. За формою і інтенсивністю забарвлення вивільнені з АМС клітини практично не відрізнялися від контрольних, що не піддавалися інкапсуляції в АМС.

Також була показана здатність МСК після інкапсуляції вступати до диференціювання в остеогенному напрямку (рис. 3.17). При культивуванні МСК в остеогенному середовищі спостерігалася поява клітин різної морфології: від типових веретеноподібних до полігональних, сильно розпластаних клітин з декількома відростками, - на відміну від контрольної культури, де клітини зберігали фібробластоподібну морфологію. Забарвлення індукованих культур за допомогою Alizarin Red S в червоний колір свідчило про накопичення кальцію.

При культивуванні досліджуваних клітин у середовищах без індукторів утворення та накопичення продуктів диференціювання не спостерігались. Здатність вивільнених з АМС МСК до спрямованого диференціювання в умовах моношарового культивування свідчила на користь їхньої специфічної функціональної повноцінності, а саме наявності адипо- та остеогенного потенціалів.

Насьогодні існує цілий ряд методів, що дозволяють здійснювати інкапсуляцію в АМС, до яких відносяться метод з використанням потоку повітря [228, 229], мікросоплової решітки [230], метод електророзпилення [231, 232], вібраційний метод [233] та інші [234], ряд з них вже мають свою реалізацію у вигляді готових приладів (NovaMatrix/FMC BioPolymer, Швейцарія, BUCHI Labortechnik AG, Швейцарія та NISCO Engineering AG, Швейцарія). Але комерційно доступні пристрої для інкапсуляції є дорогими і не завжди придатні для формування у стерильних умовах полімерних мікросфер, що містять живі клітини [188]. Крім того, застосування далеко не всіх методів гарантує відтворення генерацію сферичних АМС сталої форми з вузьким розподілом за розмірами та структурною цілісністю, що є вельми важливим при застосуванні АМС *in vivo*. Результати даної роботи показали, що однорідні сферичні АМС з діаметром 200 або 300 мкм ($\pm 7\%$), можуть бути отримані із 2,0 %-го розчину

альгіната низької в'язкості із застосуванням електророзпилення, чого проблематично було досягти при використанні інших підходів або відносно низької напруги у випадку електророзпилення (Таблиця 3.1) [231].

Таблиця 3.1. Характеристика деяких широко використовуваних способів інкапсуляції.

| Спосіб інкапсуляції | Розмір АМС, мкм | Розподіл за розміром, % | Однорідність за формою та розміром |
|--|------------------------|--------------------------------|---|
| Електророзпилення (висока напруга) | 100-200 | >10 | Так |
| Потік повітря | 200-350 | <10 | Так |
| Струменевий метод | 50-100 | <10 | Ні |
| Метод з використанням соплової решітки | 100-300 | >20 | Ні |

Можливість отримання АМС розміром близько 100 мкм з вузьким розподілом за розмірами була показана Zhang та He при застосуванні досить низької напруги, не більше 2 кВ, при відстані до гелюючого розчину 5,5 мм [186]. Однак застосування такої напруги при такій відстані до гелюючого розчину створює електричне поле з досить високою напруженістю близько 3 кВ/см, що може впливати на весь процес інкапсуляції (наприклад, викривлення конусу розпилення, електростатичне перемішування гелюючого розчину та ін.). У даній роботі розроблена і запатентована система для інкапсуляції із використанням більш високої напруги із напруженістю електричного поля не вище 2 кВ/см, яка дозволила досягти стабільного і відтворюваного формування АМС.

У порівнянні з іншими підходами висока напруга досить рідко застосовується для інкапсуляції живих клітин. Тому на першому етапі роботи була поставлена задача встановити, наскільки висока напруга здатна забезпечувати розмір одержуваних АМС з вузьким розподілом, уникаючи при цьому пошкодження структури. Також був досліджений вплив такої напруги на життєздатність та функціональні характеристики МСК у складі АМС при культивуванні. Було з'ясовано, що застосування високої напруги при утворенні мікросфер з клітинами не впливає на життєздатність клітин: МСК, інкапсульовані

у 2,0 %-й розчин альгінату із застосуванням електророзпилення, залишаються життєздатними по всьому об'єму АМС як безпосередньо після формування мікросфер, так і при подальшому культивуванні в АМС впродовж 5 діб.

Інкапсульовані у гідрогелеві АМС клітини залишаються життєздатними, проте не проліферують, що виходить з результатів Alamar Blue-теста та візуального спостереження. У роботі Nicola C. Hunt і співавт. [200] зупинка проліферації фібробластів в АМС була додатково підтверджена відсутністю експресії PCNA (ядерний антиген проліферації клітин) у ядрах. Така зупинка проліферації є оборотною, і після вивільнення МСК з АМС була продемонстрована нормальна їх мітотична активність. Це спостереження є особливо важливим з точки зору використання інкапсульованих клітин для замісної терапії пошкоджених тканин. Показано, що *in vitro* та *in vivo* структура альгінатного гідрогелю з часом руйнується внаслідок вимивання кальцію з поперечних зв'язків [3], це приводить до вивільнення інкапсульованих клітин і, отже, відновлення їхньої проліферації.

Відомо, що поведінка клітин у тканиноінженерних конструкціях певною мірою регулюється механічними властивостями підложки [235], [236], а альгінатний гель, сформований із різних за концентрацією розчинів гелеутворювача, має різні механічні властивості [79]. Авторами робіт [237, 238] було висловлене припущення, що альгінатний гідрогель може впливати на життєздатність та проліферацію клітин або за рахунок вивільнення досить активних іонів кальцію, або внаслідок присутності вільних мономерів альгінату у середовищі. Але ніяких відмінностей у життєздатності та рості моношару МСК, що культивували у присутності або за відсутності надлишку іонів кальцію та альгінату, не спостерігалось [237, 238]. Таким чином, безпосередня присутність кальцію та альгінату не несе відповідальності за відсутність проліферації клітин. Про це свідчить і оборотність зупинки проліферації, виявлена в нашій роботі. Тому цілком ймовірно, що відсутність мітотичної активності інкапсульованих у АМС МСК обумовлена механічною ізоляцією клітин одна від одної шарами альгінатного гідрогелю. Ця механічна ізоляція перешкоджає взаємодії між

клітинами по типу «клітина-клітина», яка, як відомо, модулює зростання та мітотичну активність клітин у моношарі [239].

З таким поясненням перебігу подій узгоджується той факт, що більшість фібробластів у товщі екстраклітинного матриксу м'яких тканин, таких як дерма шкіри, не експресують PCNA і, таким чином, знаходяться у стані «спокою» до моменту пошкодження тканини і руйнування їхнього механічного каркасу [240]. У роботах [241, 242] було показано, що утворений з 2,0 %-го розчину альгінату гідрогель досить точно та ефективно моделює екстраклітинний матрикс м'яких тканин, дозволяючи дифундувати поживним речовинам, вивільнятися продуктам метаболізму та сигнальним молекулам, щоб підтримувати життєздатність клітин різних типів у складі АМС.

Підхід, який був застосований у даній роботі для інкапсуляції МСК, забезпечував перебування клітин у гелі як дискретних одиниць у каркасі, запобігаючи при цьому утворенню міжклітинних контактів. Це, ймовірно, також зумовило збереженість життєздатності клітин на високому рівні протягом культивування. Імобілізація та ізоляція клітин можуть бути відповідальними і за зниження їхньої метаболічної активності у порівнянні до клітин у моношарі, на користь чого свідчать дані роботи [240], де культивування клітин у присутності альгінату, цитрату натрію та хлориду кальцію не змінювало їхньої метаболічної активності. Окрім того, зниження метаболічної активності МСК у складі АМС може зумовлюватися і такими чинниками, як відсутність адгезії та проліферації, механічний тиск, сприятливі умови для утримання клітин у стані спокою та ін. Проте для більш детального вирішення даного питання необхідне проведення цілеспрямованих додаткових досліджень.

Дослідження проліферації, метаболічної активності та диференціовальних властивостей МСК після вивільнення з АМС показали, що визначена процедура інкапсуляції з використанням високої напруги не чинить негативного впливу на ці характеристики МСК.

Матеріали розділу 3 опубліковані в роботах [243–248].

РОЗДІЛ 4. КРІОКОНСЕРВУВАННЯ МСК У СКЛАДІ АМС

Важливість тривалого збереження стовбурових/прогеніторних клітин у формах, які б забезпечували максимально швидке їхнє використання після деконсервації, є незаперечною для розвитку цілої ланки сфер людської діяльності. Загальноживаним підходом для довгострокового зберігання МСК є кріоконсервування суспензій клітин, яке включає повільне заморожування під захистом кріопротектора ДМСО у концентрації 5-10 % з подальшим зануренням у рідкий азот. Застосування у сучасній лабораторній та клінічній практиках МСК, інкапсульованих в АМС, потребує розробки способів їхнього довгострокового зберігання і транспортування: технології, розроблені для клітинних суспензій, можуть бути непридатними для клітин, інкапсульованих в АМС, де просторова організація альгінатного гідрогелю є додатковим чинником, що впливає на дифузію і перерозподіл речовин у системі «клітина-навколишнє середовище». Раніше, в нашій лабораторії було показано, що програмне повільне двоетапне заморожування з швидкістю 1 град/хв на першому етапі у присутності ДМСО забезпечує високу збереженість МСК в АМС тільки при умові залучення ініціації кристалоутворення та за використання в кріозахисному розчині не менше 10 % ДМСО [187]. Кріоконсервовані таким чином МСК у складі АМС зберігали високу життєздатність, метаболічну активність та здатність до мультилінійного індукованого диференціювання і не мали відмінностей за досліджуваними показниками від МСК, кріоконсервованими у вигляді клітинної суспензії. Відмінність за розміром АМС, застосованих у попередніх дослідженнях, від гідрогелевих мікросфер, отриманих в даній роботі за допомогою електророзпилення, зумовила необхідність проведення нами наступних досліджень щодо кріоконсервування АМС з МСК. В цих дослідженнях нами була здійснена спроба залучити попереднє теоретичне обґрунтування і математичний розрахунок до вибору найбільш ефективного режиму заморожування для даного конкретного об'єкта. Окрім того, ми намагалися отримати високі показники збереженості клітин за меншої концентрації кріопротектора.

З урахуванням вищезазначеного у даній роботі була досліджена осмотична реакція МСК в суспензії та у складі АМС в перебігу експозиції їх в 1М-му розчині ДМСО, здійснені теоретичне моделювання процесів дегідратації клітин при різних режимах заморожування і порівняння результатів моделювання з експериментально отриманими результатами.

4.1. Визначення осмотичної поведінки МСК в розчині кріопротектора та при охолодженні з різними швидкостями

Проникність плазматичних мембран для молекул води і для кріопротекторів - найважливіші з точки зору кріобіології характеристики клітин, що визначають їхню осмотичну поведінку в процесі кріоконсервування, а в підсумку – збереженість після відігрівання і перенесення у фізіологічні умови. Тому визначення коефіцієнтів проникності мембран клітин для речовин, кріозахисні властивості яких вивчаються, є необхідним етапом кріобіологічних досліджень.

У даній роботі було проведено дослідження осмотичної реакції МСК у вигляді суспензії та у складі АМС на 1 М розчин ДМСО, що містив ізотонічну концентрацію хлористого натрію, за температури 22 °С. На серії представлених мікрофотографій простежується динаміка змін МСК при експозиції з кріопротектором (рис. 4.1). Видно, що осмотична реакція МСК (швидка дегідратація та подальша повільна регідратація) як у вигляді суспензії, так і у складі АМС повністю завершувалася до 5-ї хвилини експозиції і не супроводжувалася помітними порушеннями клітинної структури. При цьому дегідратація МСК у складі АМС відбувалась більш повільно й плавно за часом, тоді як МСК у вигляді суспензії досить швидко реагували на додавання кріопротектора.

На рис. 4.2. наведені результати експериментально визначеного відносного об'єму МСК у різні моменти періоду перебування клітин в 1 М розчині ДМСО, а також отримані на їхній основі теоретичні криві залежності зміни клітинного об'єму від тривалості контакту з кріопротектором. Видно, що у складі АМС дегідратація клітин менш виражена, ніж у суспензії. Ймовірно, більш повільна

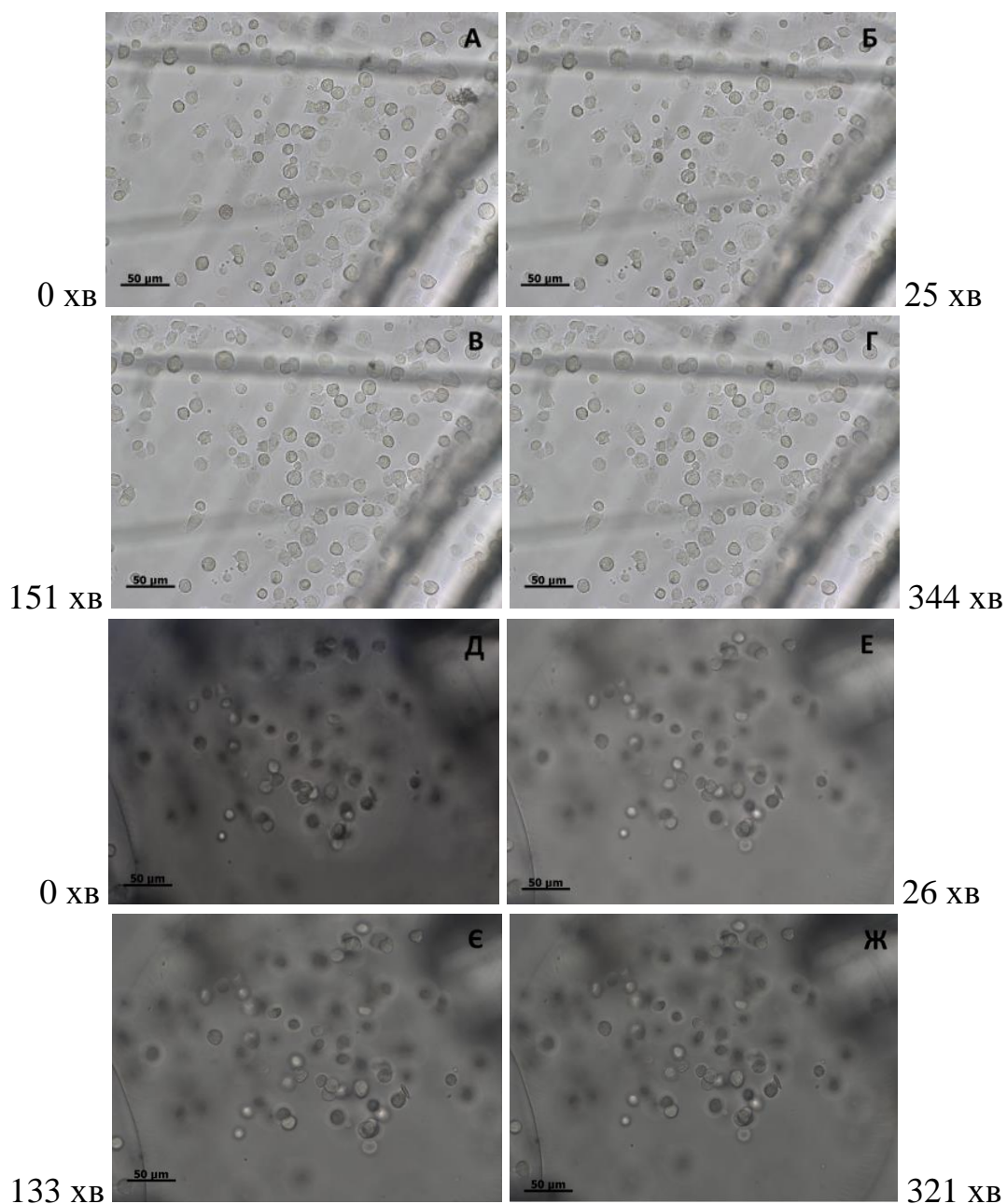


Рис. 4.1. Осмотична реакція МСК у вигляді суспензії (А-Г) та у складі АМС (Д-Ж) при експозиції у 1 М розчині ДМСО.

Примітка: Цифри - час експозиції у хвиликах; Світлова мікроскопія, $\times 250$.

реакція МСК у складі АМС є наслідком перешкоджання вільній дифузії кріопротектора у товщі альгінатного гідрогелю, а також додаткового розведення кріопротектора за рахунок об'єму утримуваної всередині АМС води.

Теоретичний розрахунок з використанням фізико-математичної моделі показав, що теоретична крива коректно описує експериментальні дані при

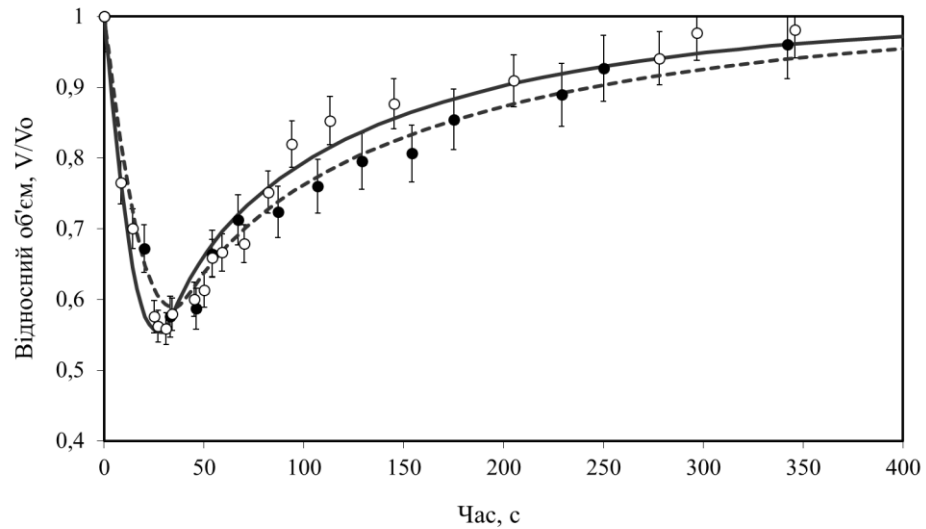


Рис. 4.2. Осмотична реакція МСК на контакт з 1 М розчином ДМСО: експериментальні значення (○) та теоретична крива (—) для МСК у вигляді суспензії, експериментальні значення (●) та теоретична крива (— —) для МСК у складі АМС.

коефіцієнтах проникності мембран МСК для молекул води (L_p) і ДМСО (K_1) в суспензії

$$L_p = (3,38 \pm 1,1) \times 10^{-14} \frac{M^3}{H \cdot c},$$

$$K_1 = (1,60 \pm 0,21) \times 10^{-8} \frac{M}{c}$$

і альгінатних мікросферах

$$L_p = (2,03 \pm 1,4) \times 10^{-14} \frac{M^3}{H \cdot c},$$

$$K_1 = (1,07 \pm 0,18) \times 10^{-8} \frac{M}{c}$$

Таким чином можна зробити висновок, що швидкість проникнення води і ДМСО крізь мембрани інкапсульованих у АМС МСК менша, ніж крізь мембрани клітин у вигляді суспензії.

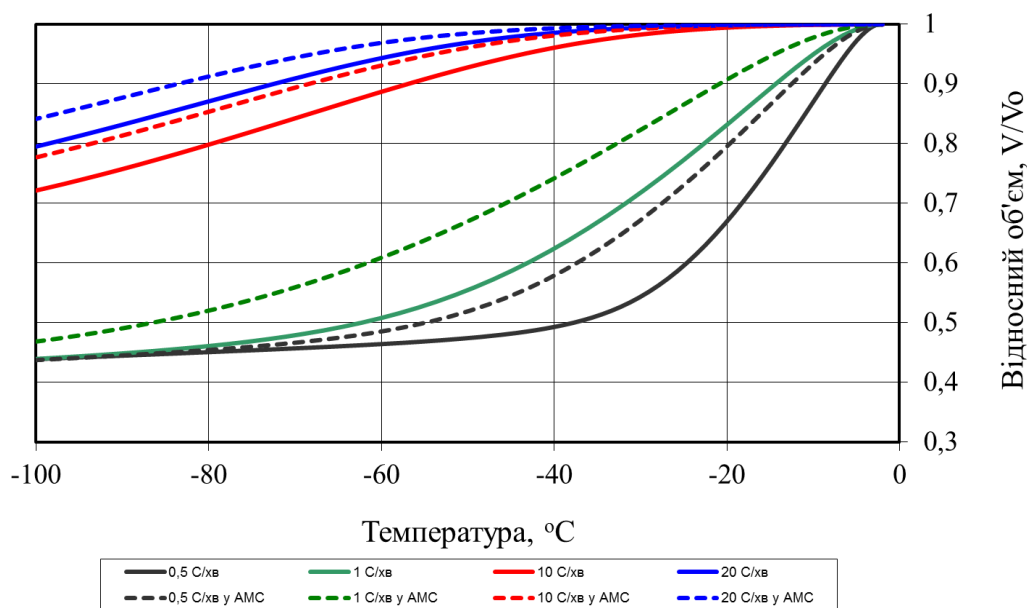


Рис. 4.3. Прогнозована динаміка зміни об'єму МСК в суспензії (—) і у складі АМС (---) в присутності 1 М ДМСО при швидкостях охолодження 0,5 (—), 1 (—), 10 (—) і 20 (—) °С/хв.

Підставляючи отримані коефіцієнти проникності до фізико-математичної моделі, яка описує кінетику зміни відносного об'єму МСК в процесі позаклітинної кристалізації суспензії [249–251], можна спрогнозувати ступінь зневоднення клітин в залежності від швидкості охолодження. З рис. 4.3. видно, що прогнозоване зневоднення клітин, які заморожувалися з швидкостями від 0,5 до 20 град/хв, при -40 °С (точка зупинки в обраному режимі заморожування) є різним. Так, за швидкості охолодження 0,5 град/хв розрахований відносний об'єм МСК в суспензії дорівнював 0,49, а у складі АМС - 0,57; за швидкості 1 град/хв - 0,62 і 0,74, відповідно. За високих швидкостей охолодження відносний об'єм клітин досягав 0,96 (швидкість охолодження МСК у суспензії 10 град/хв) та 0,99 (швидкість охолодження МСК в АМС 20 град/хв).

Таким чином, було визначено, що заморожування МСК до -40 °С в присутності 1 М ДМСО зі швидкостями 0,5 і 1 град/хв забезпечує достатню їхню дегідратацію для запобігання ушкоджень, що пов'язані з внутрішньоклітинною кристалізацією. Осмотична реакція МСК у складі АМС більш повільна в

порівнянні з клітинами в суспензії, що може мати наслідком недостатню дегідратацію клітин в процесі заморожування.

4.2. Вплив швидкості охолодження на збереженість інкапсульованих МСК при кріоконсервуванні під захистом 1 М ДМСО

Задля перевірки результатів попереднього прогнозу були проведені експерименти по заморожуванню МСК у вигляді суспензії та в складі АМС у кріозахисному середовищі з 1 М ДМСО з різними швидкостями охолодження (0,5, 1, 10 і 20 град/хв). Швидке охолодження зразків зі швидкостями 10 і 20 град/хв призводило до загибелі близько 80 % клітин, як у вигляді суспензії, так і у складі АМС (рис. 4.4.).

Слід зазначити, що за швидкості охолодження 10 град/хв життєздатність кріоконсервованих клітин у складі АМС була дещо вищою, ніж МСК у вигляді суспензії, на відміну від швидкості охолодження 20 град/хв, при якій відмінностей між групами не спостерігалось. Можливо, це пов'язано із захисною

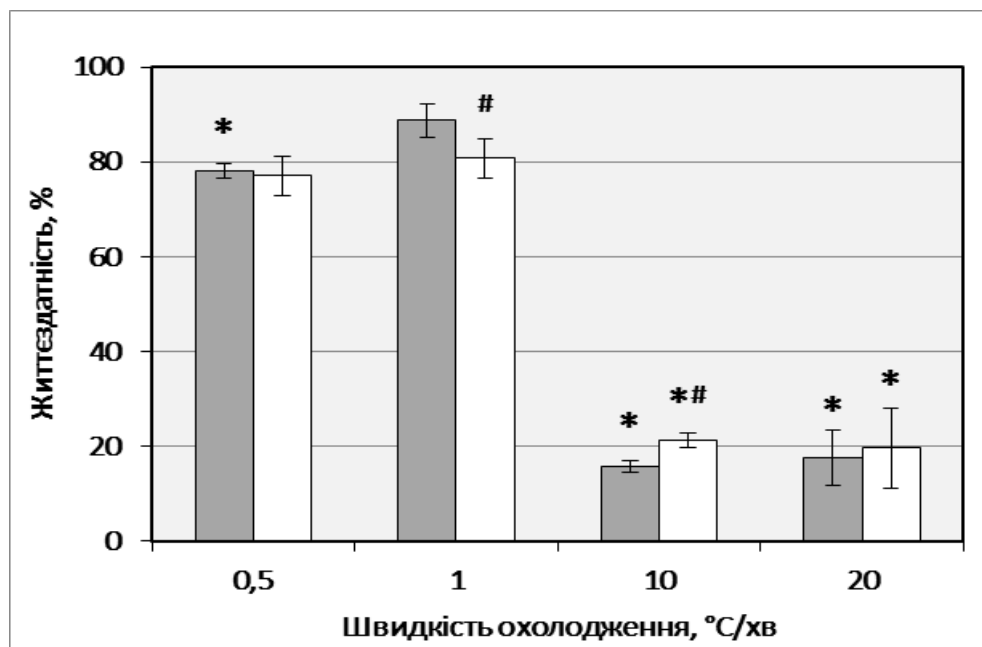


Рис. 4.4. Життєздатність МСК в суспензії (■) та інкапсульованих в АМС (□) після кріоконсервування в присутності 1 М ДМСО за різних швидкостей охолодження. Примітки: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні зі швидкістю 1 °C/хв.; # – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з суспензією МСК.

дією альгінатного гідрогелю, яка проявляється за такої швидкості охолодження [189, 252].

Крім того, за високих швидкостей охолодження мали місце порушення цілісності АМС і наявність в деконсервованих зразках фрагментів зруйнованого альгінатного гідрогелю та структурних компонентів клітин. Загибель більшої частини клітин за високих швидкостей охолодження, ймовірно, пояснюється формуванням внутрішньоклітинних кристалів льоду внаслідок зменшення часу дегідратації клітин.

Після кріоконсервування, що відбувалося з низькими швидкостями охолодження 0,5 і 1 град/хв, не було виявлено порушень цілісності АМС, а життєздатність клітин становила не менше 75 %. Максимальні значення життєздатності 88 ± 4 % були отримані після кріоконсервування МСК у вигляді суспензії зі швидкістю охолодження 1 град/хв. Життєздатність клітин після кріоконсервування за цією програмою у складі АМС була дещо нижчою і складала 81 ± 4 %. Однакові значення життєздатності МСК, кріоконсервованих у вигляді суспензії і у складі АМС, були отримані при зниженні швидкості охолодження до 0,5 град/хв.

У підсумку, експериментальні дані підтвердили теоретичні висновки, що альгінатний гідрогель уповільнює дегідратацію і обмежує перенесення ДМСО у клітину. Найбільш простим і доступним способом подолання цього обмеження є зниження швидкості охолодження зразка. Той факт, що після кріоконсервування МСК у вигляді суспензії зі швидкістю охолодження 0,5 град/хв життєздатність клітин була дещо нижчою максимальних значень, отриманих при охолодженні зі швидкістю 1 град/хв, пояснюється, ймовірно, токсичною дією ДМСО, що проявляється при довгій експозиції з ним клітин.

Отримані результати свідчать про те, що використання низьких швидкостей охолодження при кріоконсервуванні МСК у складі АМС під захистом 1 М ДМСО дозволяє досягти вищих показників життєздатності деконсервованих клітин. Заморожування МСК до -40 °С зі швидкостями 0,5 і 1 град/хв забезпечує достатню їхню дегідратацію для запобігання ушкоджень, пов'язаних із

внутрішньоклітинною кристалізацією. З'ясовано, крім того, що осмотична реакція МСК у складі АМС на перебування у розчині з кріопротектором більш повільна в порівнянні з клітинами у вигляді суспензії. Експериментально отримані дані підтвердили попередні прогнози, зроблені на основі теоретичних розрахунків, що кріоконсервування зі швидкостями охолодження 0,5 і 1 град/хв дозволить зменшити негативні прояви особливостей процесу дегідратації МСК, які перебувають у товщі альгінатного гідрогелю.

Результати даного дослідження показали, що за умов змінення наведеним вище чином параметрів на етапах кріоконсервування є можливим досягти високих значень показників життєздатності МСК після заморожування і відігрівання в присутності ДМСО у концентрації 1 М. Значення життєздатності неінкапсульованих клітин були дещо вищі у порівнянні до інкапсульованих після розморожування. При цьому слід брати до уваги, що додаткове розчинення АМС може призвести до незначної втрати клітин, зниження показника їх життєздатності та додаткового осмотичного стресу.

Мультипотентные стромальные клітини, отримані насамперед з тканин дорослої людини, мають великий потенціал щодо застосування у якості клітинної складової для регенеративної медицини. У даному дослідженні були використані МСК, отримані з дерми дорослої людини, з метою поліпшення їх життєздатності та цілісності після кріоконсервування. Спочатку було висунуто припущення, що додаткова інкапсуляція цих клітин в альгінатних гідрогель разом з оптимізацією параметрів заморожування, такими як концентрація ДМСО та час утримання клітин з ним, може поліпшити виживання клітин після відігрівання. У разі кріоконсервування неінкапсульованих клітин, отриманих з різних видів та джерел, високого збереження після кріоконсервування можна досягти шляхом зниження концентрації цитотоксичних агентів. У багатьох роботах було продемонстровано можливість зниження концентрації ДМСО шляхом використанням додаткових агентів, таких як спирти (поліетиленгліколь, пропіленгліколь) та цукрів (трегалоза, сахароза), тоді як концентрація

використаної сироватки варіювала від 15 до 90 % [171, 253]. Хоча криоконсервування інкапсульованих у альгінатний гідрогель клітин можлива в умовах менш цитотоксичних агентів, інформація щодо впливу концентрації ДМСО та інтервалу інкубації з ним на результати криоконсервування інкапсульованих у АМС МСК є ще обмеженою [11, 254, 255].

У роботі Sambu та ін. [256] було показано, що цілісність мембран ЕСК миші зазнавала впливу від часу інкубації клітин з ДМСО. Цікаво, що у даній роботі було встановлено, що перебування клітин у складі альгінатного гідрогелю під час інкубації з ДМСО призводить до уповільнення його проникнення у клітини, що безперечно впливає на інтервал інкубації із криопротектором, знижуючи його цитотоксичний вплив. Проте, ДМСО є токсичною речовиною для клітин [164] та його дія може результатом за умови тривалого впливу на інкапсульовані у АМС клітини, адже ДМСО є невеликою молекулою і може вільно дифузувати всередину пористої структури альгінату до інкапсульованих клітин [256]. У свою чергу, підвищений градієнт концентрації прискорює дифузію молекул, що призводить до захисного впливу альгінату при коротших термінах інкубації, тоді як токсичний вплив ДМСО стає більш вираженим при більш тривалій інкубації. Це може слугувати у якості підтвердження отриманих у даній роботі даних, де максимальний відсоток клітин був виявлений за оптимальної швидкості охолодження (1 °С/хв). Більш повільне охолодження (0,5 °С/хв) мало сприяти збереженню клітин, проте за результатами досліджень призводило до зниження життєздатних клітин після відігріву, що може бути результатом загибелі частини клітин ще на етапі більш тривалої інкубації. Хоча застосування різноманітних носіїв, доповнювачів та середовищ для криоконсервування клітин у складі тривимірних структур з використанням ДМСО запропоновується по всьому світу з метою впровадження "золотого стандарту", існує лише декілька досліджень, спрямованих на розробку відповідної моделі дифузії ДМСО крізь гелеподібні структури [256, 257].

Структура альгінатних мікросіер може бути змінена концентрацією ДМСО та інтервалами інкубації з ним, що безперечно призведе до різної реакції

альгінатних мікросфер на кріоконсервування та відігрівання. Крім того, температура формування кристалів льоду, що є важливим параметром для досягнення оптимального результату кріоконсервування [258], також може істотно відрізнятися. Температура утворення кристалів позаклітинного льоду під час заморожування інкапсульованих у альгінатні мікросфери клітин може суттєво вплинути на загальний результат кріоконсервування, тоді як температура утворення кристалів льоду може додатково залежати й від часу інкубації з ДМСО. Відповідно до цього припущення нещодавно було опубліковано результати аналізу впливу температури утворення кристалів льоду на життєздатність та метаболічну активність інкапсульованих у альгінатні мікросфери МСК [259]. Крім того, було показано, що більш високі температури утворення льоду ($-12,8\text{ }^{\circ}\text{C}$) порушували структуру альгінатних мікросфер після відігрівання. Це може бути пов'язано з пошкодженнями, спричиненими за рахунок утворення кристалів льоду та/або рекристалізації льоду у процесі відігрівання. При цьому, слід зазначити, протоколи заморожування-відігрівання, що зазвичай використовуються для криомікроскопічних аналізів, включають заморожування до $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, після чого проводиться періоду інкубації при цій температурі впродовж 5 хв, під час якої і спостерігається рекристалізація утворених кристалів льоду. Це відрізняється від загальноживаних експериментів та практик кріоконсервування (заморожування до $\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) і може пояснюватися необхідністю в розробці менш трудомісткого та актуального протоколу, який дозволив би зберегти умови повільного заморожування, при цьому здатний відобразити етап рекристалізації льоду при відігріванні.

Зниження життєздатності інкапсульованих МСК може бути результатом достатньо високої чутливості клітин на більш пізніх пасажах під час кріоконсервування та/або структура альгінатного гідрогелю не може запобігти кріоушкодженням у складі тривимірної структури за не оптимальних умов. Ефект останнього можна звести до мінімуму шляхом: дослідження структурних змін альгінатних мікросфер використовуючи диференційовальну скануючу калориметрію, що є потужним інструментом для вивчення структурних змін

полісахаридів [260, 261] при заморожуванні/розморожуванні, та вивчення ефекту температури утворення льоду на життєздатність інкапсульованих клітин після відігрівання, використовуючи визначену та оптимізовану температуру утворення льоду.

Було показано, що інкапсуляція МСК, отриманих зі звичайної мавпи *Callithrix jacchus*, у альгінатні мікросфери, що імітують позаклітинну матрицю і створюють сприятливе середовище для клітин під час кріоконсервування, має кілька переваг перед замороженням клітин у суспензії [262]. У цьому дослідженні було проаналізовано вплив ДМСО за різних концентрацій (2,5-10 %) та часу попередньої інкубації МСК, інкапсульовані у альгінатні мікросфери шляхом електророзпилення, де час інкубації складав 0-45 хв. При цьому, використовували повільну швидкість охолодження (1 °C/хв) з подальшим визначенням впливу заморожування на життєздатність та метаболічну активність клітин. У наведеній роботі було встановлено, що ці параметри впливають на стабільність та однорідність альгінатних мікросфер після відігрівання. Крім того, МСК можуть бути заморожені в альгінатних мікросферах за нижчої концентрації ДМСО 7,5 % з періодом інкубації 30 хвилин, при цьому зберігаючи високі показники збереженості клітин. Цитоване дослідження підтверджує отриманні у даній дисертаційній роботі результати та припущення щодо можливості зберігання високих показників збереженості МСК за менш цитотоксичних умов та оптимізованих параметрів кріоконсервування тривимірних конструкцій. Таким чином, результати нашого дослідження з використання більш точного та обгрунтованого математичного моделювання є ще одним кроком вперед у напрямку застосування кріоконсервування для тривалого зберігання та подальшого застосування трансплантатів в клітинній терапії.

В дослідженнях Raghavan С. і співавт., де проводилась більш детальна оцінка МСК, відігрітих відразу після повільного заморожування до -60°C, були виявлені пошкодження, які відбуваються під час повільної фази охолодження, відповідно до класичних протоколів кріоконсервування. В цих експериментах доведена важливість захисту МСК за умов повільного охолодження і

підтверджена висока чутливість МСК до швидкості заморожування, а саме: підвищення швидкості охолодження лише на 1°C (з $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до $2^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) призводило до різкого збільшення кількості апоптозних клітин [263]. У даних роботах також було зроблено припущення, що апоптична програма у МСК запускається вже під час повільної фази охолодження. Це припущення підтримує висновки Carvalho K.A.T. і співавт. [264], які продемонстрували прогресуючу втрату життєздатності МСК при збільшенні швидкості охолодження у ряді $-3^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, $-5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, $-10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Таким чином, отримані при виконанні даного фрагменту дисертації результати відповідають сучасній точці зору відносно використання можливих підходів для поліпшення результатів кріоконсервування МСК.

Матеріали розділу 4 опубліковані в роботах [247, 265–267].

РОЗДІЛ 5. ГІПОТЕРМІЧНЕ ТА НОРМОТЕРМІЧНЕ ЗБЕРІГАННЯ МСК У СКЛАДІ АМС ПРИ ПОЗИТИВНИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Процес застосування кріоконсервованих клітин в будь-якій області, як правило, окрім безпосередньо заморожування-відгіріву, містить технологічні етапи короткострокового зберігання, транспортування, тощо. Невідповідні умови перебігу цих етапів можуть значно погіршити кінцевий результат консервування МСК аж до фатального. Тому, на наш погляд, вибір умов утримання клітин на таких етапах заслуговує на окрему увагу дослідників.

Для короткострокового зберігання і транспортування клітин широко застосовують позитивні температури нижчі за фізіологічні, властиві теплокровним тваринам. Саме температура, а також склад середовища зберігання є основними параметрами, що варіюються дослідниками. Інкапсуляція клітин в АМС надає можливість залучити до аналізу ще один параметр, а саме – просторове розташування клітин у середовищі. Природна седиментація у дисперсійній системі, яку являє собою суспензія клітин, призводить з часом до ситуації, коли окремі клітини знаходяться в різних умовах, що значно погіршує контрольованість та прогнозованість результатів зберігання. Цю обставину можна усунути шляхом постійного перемішування клітинної суспензії, підвищення в'язкості середовища зберігання або, що викликало в нас найбільший інтерес, формування певного оточення клітин за допомогою їх інкапсуляції у АМС.

Таким чином, метою даного дослідження було порівняльне вивчення структурно-функціонального стану і здатності до індукованого диференціювання МСК, що зберігалися за позитивних температур у вигляді клітинних суспензій або у складі АМС.

5.1. Зберігання МСК у культуральному середовищі за 37, 22 і 4 °С

МСК дерми людини у вигляді суспензії і інкапсульовані у АМС витримували за нормо- та гіпотермічних умов протягом 1-3 діб в герметично закритих пробірках у культуральному середовищі, призначення якого

максимальним чином забезпечувати життєдіяльність МСК за умов моношарового культивування. Слід зауважити, що поведінка МСК в умовах моношарового культивування, а саме проліферативна активність клітин, є однією з визначальних ознак МСК.

Проведений на першому етапі дослідження візуальний контроль за станом суспензій МСК показав, що при зберіганні їх в гіпотермічних умовах (4 °С) після 1-ї доби відбувалася седиментація клітин з утворенням рухливого осаду, щільність якого до 3-ї доби у деякій мірі збільшувалася, однак при легкому струшуванні пробірки з нього утворювалася гомогенна клітинна суспензія. Колір культурального середовища, що відображає рН, протягом 3 діб за 4 °С не змінювався.

Експонування суспензій МСК протягом 3 діб в умовах помірної гіпотермії за 22 °С також призводило до формування клітинного осаду без зміни рН середовища, однак струшування його давало неоднорідну суспензію, в якій були присутні клітинні агрегати невеликих розмірів.

При зберіганні клітинних суспензій за нормотермічних умов при 37 °С вже після 1-ї доби утворювався досить щільний осад, який вимагав певних зусиль для його суспендування. Отримана з такого осаду суспензія складалася переважно з клітинних агрегатів і неклітинних тяжів, причому агрегати були більші за розміром та щільніші, ніж ті, що формувалися при 22 °С. Крім того, починаючи вже з 2-ї доби спостерігалось закислення культурального середовища.

Візуальне спостереження протягом 3-х діб за станом АМС з МСК, що перебували за температур 4, 22 і 37 °С, не виявило змін у стані мікросфер з клітинами і культурального середовища: клітини, інкапсульовані у АМС, залишалися відокремленими, клітинні агрегати не формувалися, колір середовища зберігання не відрізнявся від контролю.

Визначення життєздатності і таких морфофункціональних показників стану МСК як здатність до адгезії і метаболічна активність підтвердило відмінності у стані клітин після зберігання, зумовлені особливостями їхнього просторового

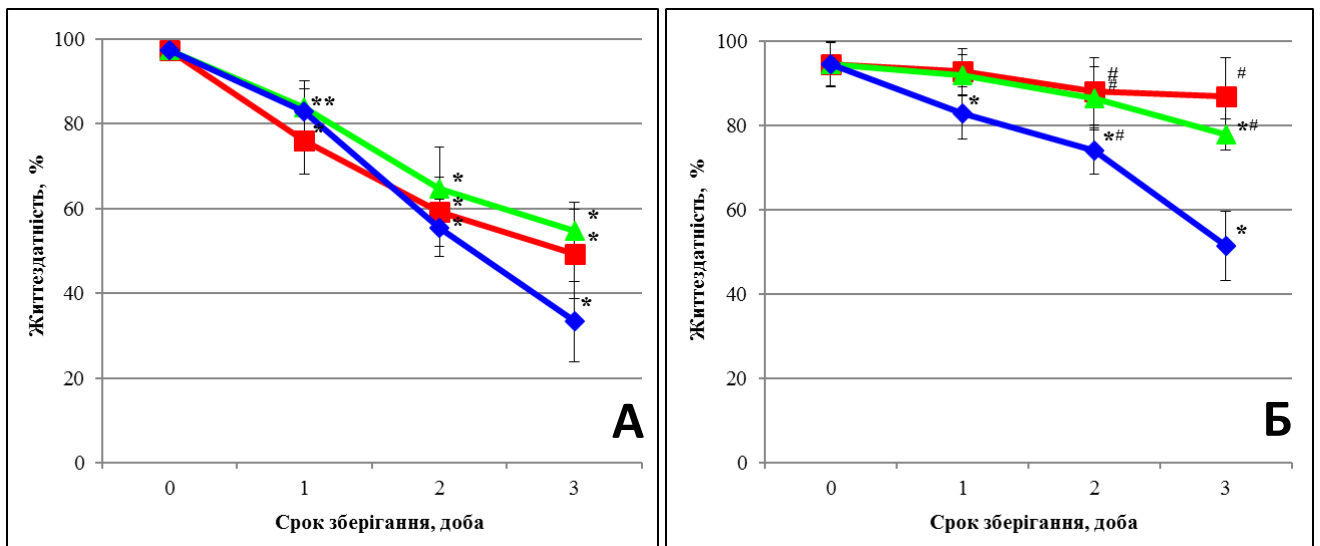


Рис. 5.1. Життєздатність МСК впродовж зберігання у культуральному середовищі у вигляді суспензії (А) і у складі АМС (Б) при 4 (◆), 22 (▲) та 37 (■) С за МТТ-тестом.

Примітка: Відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем (*) і суспензією МСК (#).

розташування, тобто, перебували вони в суспензії або були інкапсульовані в АМС.

З рис. 5.1. видно, що зберігання МСК у вигляді суспензії за усіх температур супроводжувалося поступовим зниженням життєздатності клітин за МТТ-тестом, достовірні відмінності спостерігали вже після 1-ї доби. Після 3-х діб зберігання МСК у вигляді суспензії за 22 і 37 °С життєздатність становила близько 50 %. У разі гіпотермічного зберігання за 4 °С зниження цього показника було ще більш вираженим - до 30 %.

Інкапсульовані у АМС МСК краще переживали короткострокове зберігання. Після 1-ї доби достовірне зниження життєздатності спостерігали тільки у разі зберігання інкапсульованих у АМС клітин за гіпотермічних умов при 4°С, використання температур 22°С і 37°С дозволяло підтримувати рівень життєздатності МСК на цьому етапі близький до початкового. Достовірне зниження життєздатності інкапсульованих у АМС МСК при зберіганні в помірно гіпотермічних умовах за 22 °С спостерігали лише на кінцевому терміні

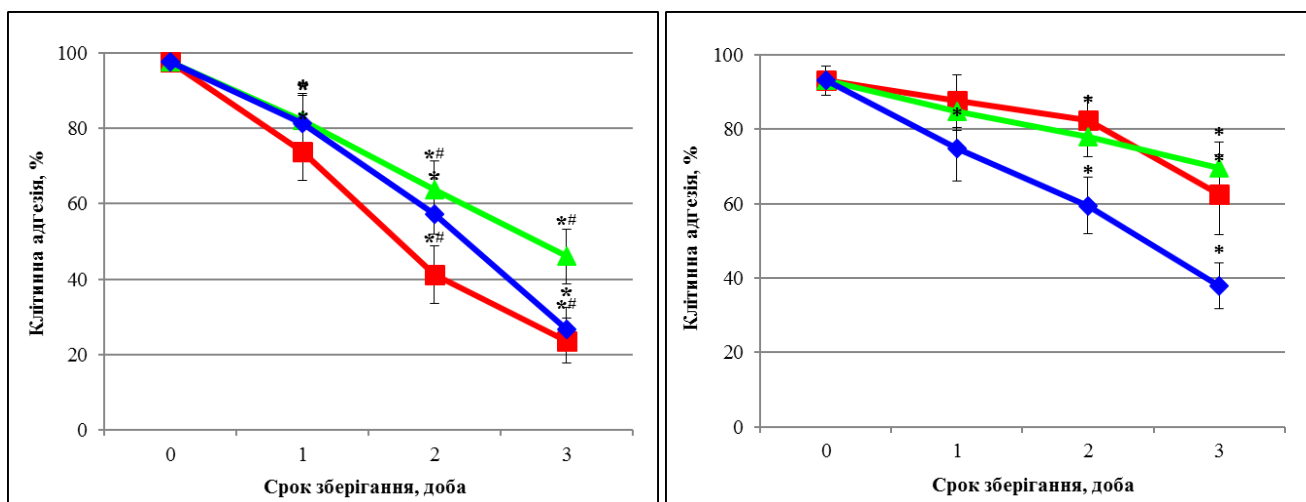


Рис. 5.2. Здатність до адгезії МСК після їхнього зберігання у культуральному середовищі у вигляді суспензії (А) і у складі АМС (Б) при 4 (◆), 22 (▲) та 37 (■)°С.

Примітка: Відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем (*) і суспензією МСК (#).

зберігання, при цьому відсоток клітин, що накопичували формаган, залишався досить високим - 78 ± 4 % - і значно перевищував цей показник для МСК у вигляді суспензії. Зберігання інкапсульованих у АМС МСК у культуральному середовищі за 37°С протягом 3-х діб не супроводжувалося втратою життєздатності, що зумовило різницю між показниками МТТ-тесту для суспензії і інкапсульованих у АМС МСК практично у 40 % (87 ± 9 % і 49 ± 10 % , відповідно).

В ході гіпотермічного зберігання за 4 °С інкапсульованих у АМС МСК відзначали поступове зниження життєздатності протягом усього терміну спостереження, в результаті чого на 3-ю добу зберігання життєздатність інкапсульованих клітин відповідала рівню цього показника для клітин в суспензії. Перевага МСК у складі АМС при гіпотермічному зберіганні виявлялася тільки на терміні спостереження 2 доби, коли життєздатність інкапсульованих МСК була на 20 % вища життєздатності клітин у суспензії.

Здатність МСК прикріплюватися до культурального пластику є однією з визначальних характеристик цих клітин, вона реалізується завдяки складному

каскаду реакцій і інтегрально відображає ступінь збереження клітин. Зберігання суспензій МСК за усіх досліджених температур призводило до поступового зниження їхньої здатності прикріплюватися до підложки (рис. 5.2.). У результаті на 3-ю добу тільки 20 % клітин суспензії, які експонували за 4 і 37 °С, були здатні прикріплюватися до пластику. Використання помірної гіпотермії (22 °С) в меншій мірі впливало на цей показник, здатність МСК прикріплюватися до підложки зберігалася у більш ніж 40 % клітин.

Зміни в здатності прикріплюватися до підложки МСК, що піддавали зберіганню у складі АМС, у загальних рисах відповідали динаміці змін життєздатності, що були отримані за допомогою МТТ-тесту (рис.5.1 Б). При цьому здатність до прикріплення МСК, що зберігалися у складі АМС за 22 і 37 °С, істотно перевищувала таку для суспензій. Хоча достовірно зниження цього показнику порівняно з початковими контрольними даними відзначалося після двох діб зберігання, до кінця експерименту відсоток МСК, здатних до прикріплення, залишався високим і становив 62 ± 10 % в разі 22°С і 69 ± 7 % в разі 37°С. Цей рівень значно перевищував також результати зберігання інкапсульованих у АМС клітин за 4°С. Здатність до прикріплення МСК, що були піддані гіпотермічному зберіганню (4°С) у складі АМС, не відрізнялася від цього показника для клітин, що зберігалися у вигляді суспензії.

Таким чином, отримані результати виявили певні переваги короткострокового зберігання клітин у складі альгінатних мікросфер порівняно із зберіганням клітин у вигляді суспензії, але задля ґрунтовності такого висновку необхідні дослідження морфофункціональних характеристик МСК (метаболічна активність, диференціувальний потенціал тощо) в умовах моношарового культивування.

За стандартних умов культивування МСК, що після короткострокового збереження успішно пройшли етап адгезії, розпластувалися, набували фібробластоподібної морфології, активно проліферували і в подальшому формували рівномірний моношар.

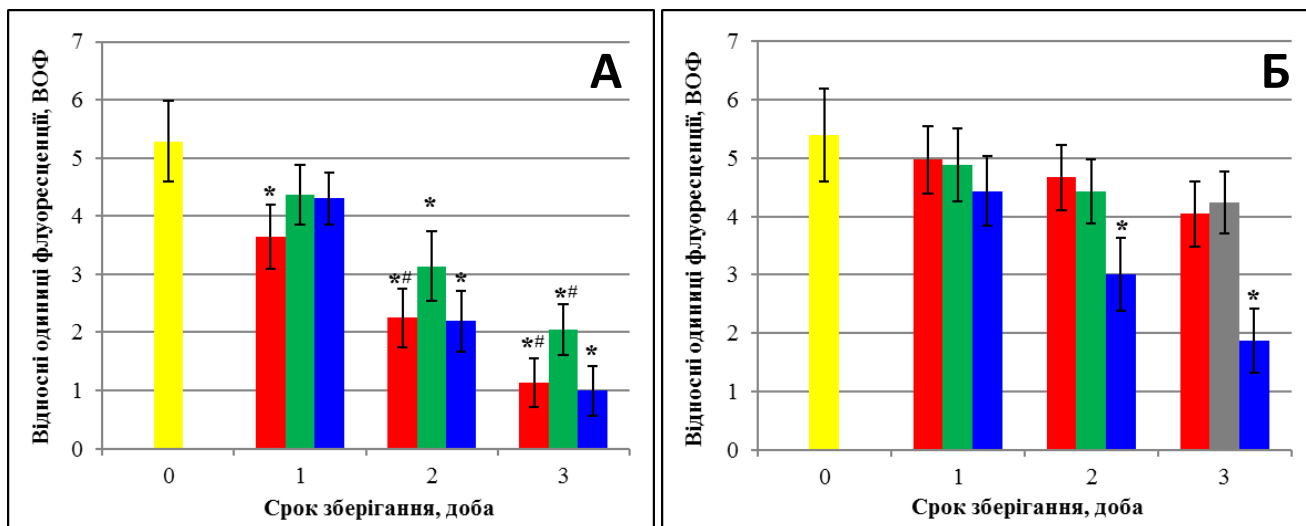


Рис. 5.3. Метаболічна активність за АВ-тестом культур МСК, отриманих після зберігання клітин у культуральному середовищі у вигляді суспензії (А) і у складі АМС (Б) при 4 (◆), 22 (▲) та 37 (■) С (2-а доба культивування).

Примітка: Відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем (*) і суспензією МСК (#).

Для інтегральної оцінки стану МСК у культурі використовували АВ-тест, що відображає активність метаболічних процесів в клітинах загалом. Оцінку проводили після 1-ї доби моношарового культивування (рис. 5.3). Культури МСК, отримані після зберігання клітин у вигляді суспензії за усіх досліджуваних температур, проявляли нижчу метаболічну активність ніж контрольні культури і різниця між ними зростала із збільшенням терміну зберігання. В разі затосування нормотермічних умов зберігання (37 С) різниця визначалася як достовірна вже після 1 доби зберігання, за гіпотермічних та помірно гіпотермічних умов – після 2-х діб зберігання у (рис.5.3 А).

Культури МСК, отримані після гіпотермічного зберігання клітин за 4 °С як у вигляді суспензій, так і інкапсульованими в АМС, були здатні відновлювати значно меншу кількість АВ, ніж контрольні культури: для культур МСК, що пройшли зберігання протягом трьох діб, це становило $0,99 \pm 0,42$ ВОФ в разі зберігання у вигляді суспензії та $1,86 \pm 0,55$ ВОФ в разі інкапсульованих МСК, у той час як для контрольних культур був характерним рівень $5,28 \pm 0,69$ - $5,4 \pm 0,79$ ВОФ.

Такі ж зміни в метаболічній активності культур МСК відзначалися і після зберігання клітин за гіпотермічних умов (4 °С) у складі АМС (рис.5.3 Б), при цьому достовірних відмінностей між результатами зберігання МСК у вигляді суспензії та у складі АМС не відмічалось. Культури МСК, отримані після гіпотермічного зберігання клітин у вигляді суспензій були здатні відновлювати АВ на рівні $0,99 \pm 0,42$ ВОФ, а після зберігання у складі АМС – на рівні $1,86 \pm 0,55$ ВОФ, у той час як контрольні культури демонстрували значно вищий рівень метаболічної активності – $5,28 \pm 0,69$ - $5,4 \pm 0,79$ ВОФ.

Лише для культур МСК, зберігання яких відбувалося у складі АМС за 22 і 37°С, показники АВ-тесту не мали істотних відмінностей від рівня контролю - $4,04 \pm 0,56$ - $4,24 \pm 0,52$ ВОФ після трьох діб зберігання. Отже, інкапсуляція МСК в АМС не є погіршуючою умовою для короткострокового зберігання клітин за позитивних температур, а за нормотермії та помірної гіпотермії забезпечує значно кращу виживаність клітин в разі зберігання у культуральному середовищі. Задля остаточності цього висновку необхідно також пересвідчитися у збереженості специфічних властивостей МСК, в першу чергу здатності до мультилінійного диференціювання.

Результати виявлення здатності культур МСК, отриманих після зберігання клітин у культуральному середовищі за різних позитивних температур, до адипогенного диференціювання представлені на рис. 5.4. При культивуванні контрольних культур МСК в адипогенному середовищі на 3-му тижні виявлялися клітини округлої форми з цитоплазматичними ліпідними включеннями, які позитивно фарбувалися за Oil Red O. Таку ж картину розвитку адипогенезу спостерігали і при культивуванні МСК, що попередньо зберігалися у складі АМС при досліджуваних температурах: через 3-х тижні культивування в індуктивному середовищі спостерігалась поява клітин, що накопичували нейтральні ліпіди. В контролі на спонтанне диференціювання після культивування у середовищі без індукторів адипогенезу позитивного забарвлення Oil Red O не виявлялося.

Результати виявлення остеогенного диференціювання в культурах МСК представлені на рис. 5.5. Починаючи з 2-го тижня культивування в остеогенному

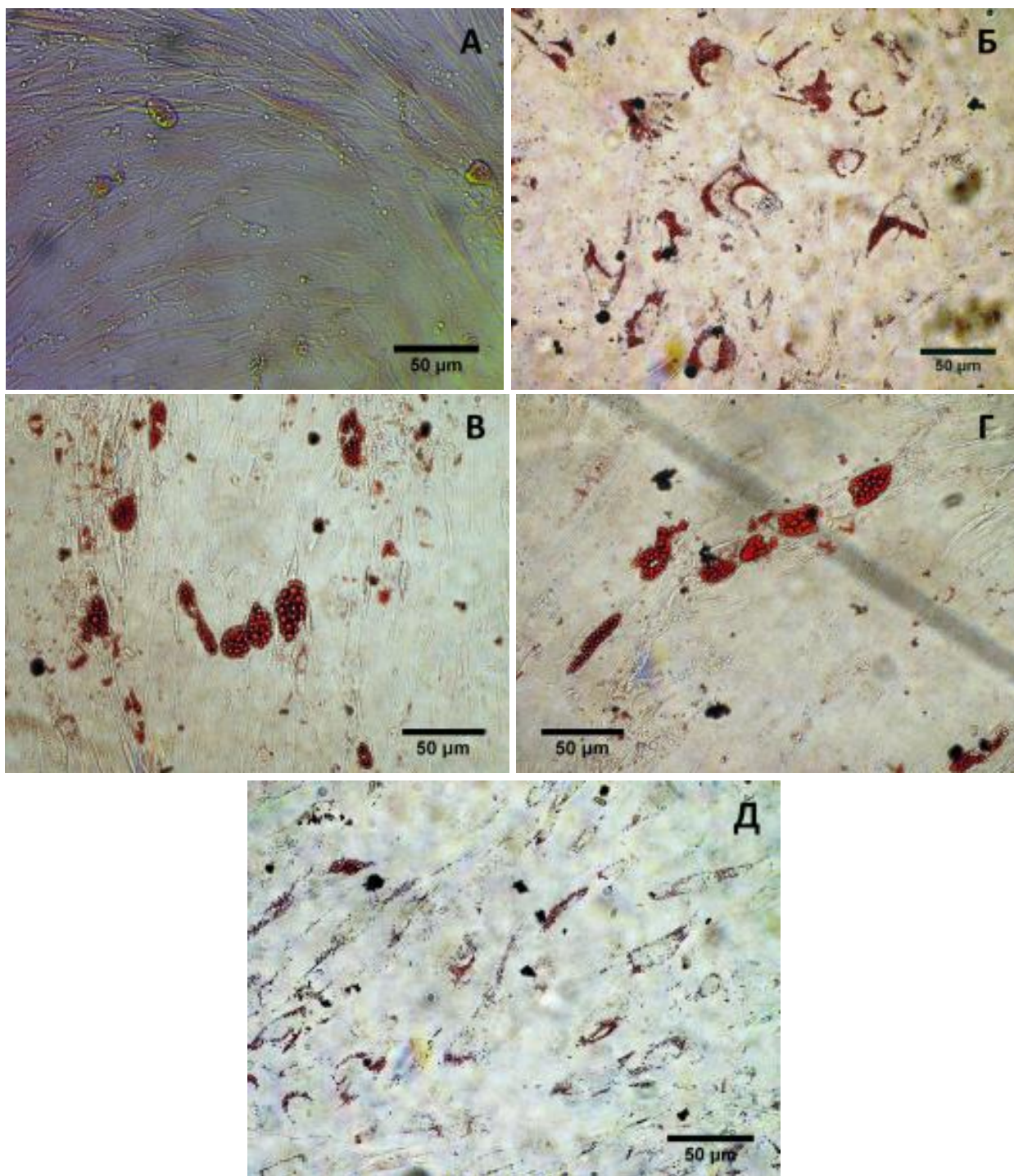


Рис. 5.4. Виявлення адипогенного диференціювання в культурах МСК, отриманих з клітин, що не піддавалися зберіганню (Б) та після зберігання протягом 3-х діб у складі АМС при 37°С (В), 22°С (Г) і 4 (Д) °С, за відсутності (А) та в присутності індукторів адипогенного диференціювання (Б-Д). Забарвлення Oil Red O.

середовищі МСК, що попередньо піддавалися зберіганню, спостерігали накопичення мінералізованого екстраклітинного матриксу. Виявлення солей кальцію шляхом забарвлення алізариним червоним після 3-х тижнів

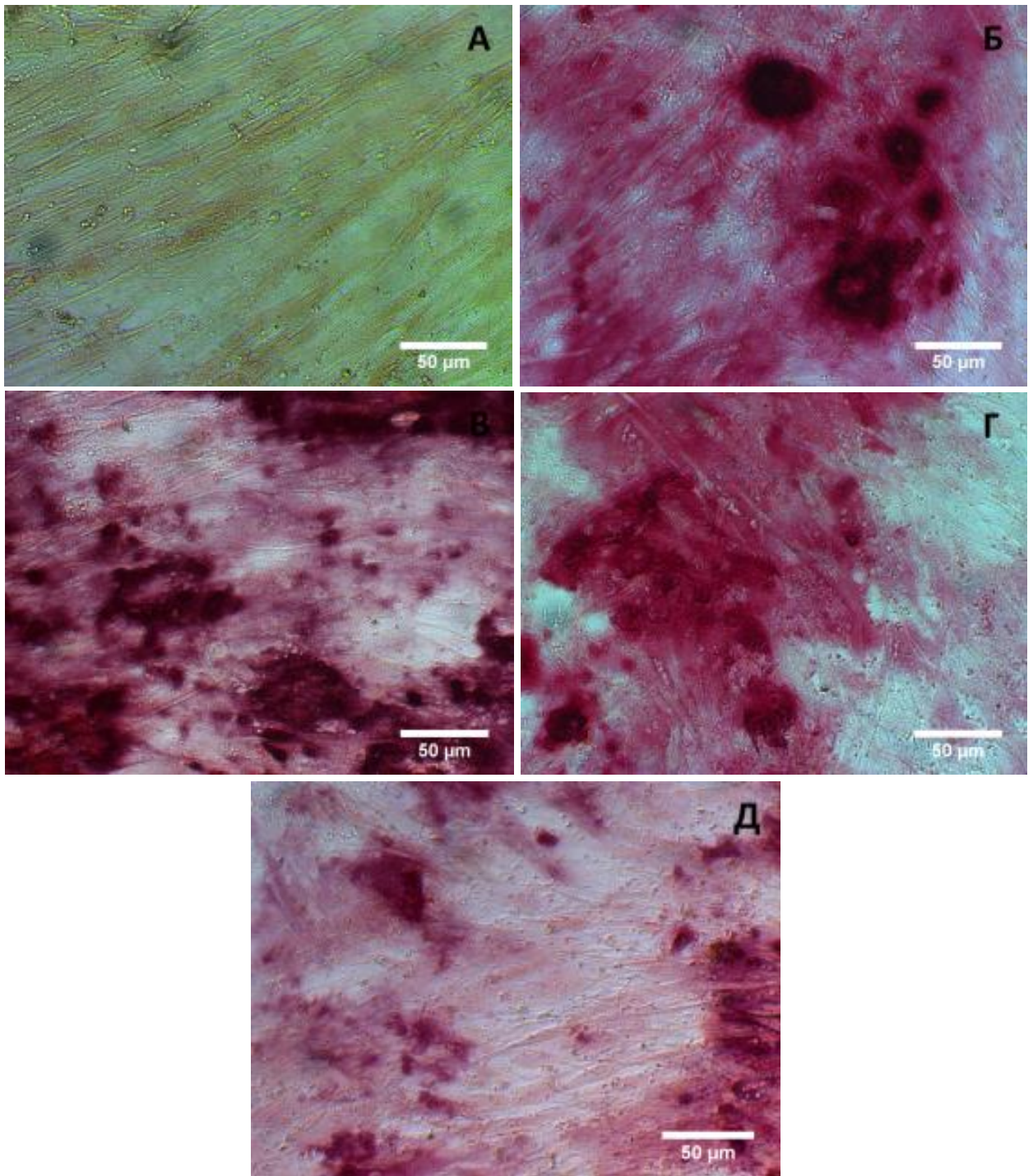


Рис. 5.5. Виявлення остеогенного диференціювання в культурах МСК, отриманих з клітин, що не піддавалися зберіганню (Б) та після зберігання протягом 3-х діб у складі АМС при 37°С (В), 22°С (Г) і 4 (Д) °С, за відсутності (А) та в присутності індукторів остеогенного диференціювання (Б-Д). Забарвлення Alizarin Red S.

культивування підтвердило характерну для остеогенного диференціювання мінералізацію матриксу. У контролі на спонтанне диференціювання накопичення мінералізованою матриксу не спостерігали.

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що МСК людини після зберігання за різних позитивних температур у складі АМС зберігають здатність до індукованого диференціювання у остеогенному та адипогенному напрямках.

Отримані результати свідчать про те, що інкапсуляція в АМС, забезпечуючи відокремлене розташування і рівномірний розподіл клітин, тим самим дозволяє подовжити терміни безпечного зберігання МСК за позитивних температур 22°C і 37 °C. При зберіганні у складі АМС клітини більшою мірою зберігають життєздатність, здатність прикріплюватися до культурального пластику, метаболічну активність, а також диференціювальний потенціал, ніж при зберіганні у вигляді суспензії. Зберігання за 4° C в культуральному середовищі, незалежно від просторової організації клітин, призводило до загибелі більшої їхньої частки. Можна припустити, що низькі значення життєздатності та метаболічної активності МСК за умов зберігання при 4 °C зумовлені невідповідністю між складом обраного середовища та напрямком та інтенсивністю метаболічних процесів, що відбуваються в клітинах за даної температури.

5.2. Гіпотермічне зберігання МСК у спеціалізованих розчинах (ССР, UW) за 4 °C

Для гіпотермічного зберігання різних типів клітин і органів широко застосовують спеціальні середовища. Одним з найбільш розповсюджених є розчин, основними компонентами якого являються лактобіонат і рафіноза, розроблений дослідниками з університету Вісконсіна (UW). Розроблений у відділі кріобіохімії ІПКіК НАН України оригінальний сахарозо-сольовий розчин (ССР), приготовлений на основі фосфатного буфера із залученням поліетиленгліколю-8000 (ПЕГ-8000), є більш дешевим і в той же час досить ефективним. Було показано, що ССР запобігає осмотичним пошкодженням, які індуковані холодовою ішемією, і підтримує метаболічні характеристики біологічних об'єктів.

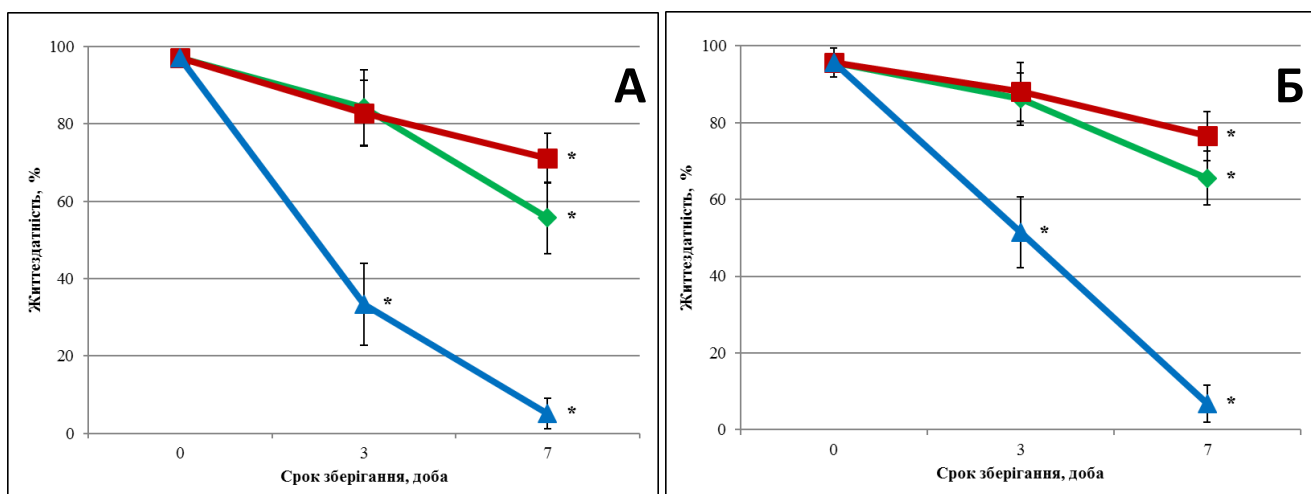


Рис. 5.6. Життєздатність МСК після зберігання у вигляді суспензії (А) та у складі АМС (Б) за 4 °С у середовищах ССР (◆), UW (■) та культуральному середовищі (▲) за МТТ-тестом.

Примітка: Відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем (*).

Ці розчини були задіяні в даній роботі як середовища для гіпотермічного зберігання МСК за 4 °С.

Ефективність обраних розчинів для гіпотермічного зберігання МСК у вигляді суспензії та після інкапсуляції у АМС оцінювали за їхньою життєздатністю, яка визначалася за допомогою МТТ-тесту. Як було показано раніше, зберігання суспензії клітин за 4 °С у культуральному середовищі призводило до зниження життєздатності до 33 ± 10 % вже на 3-ю добу (рис. 5.6.). Інкапсуляція в АМС частково запобігала загибелі клітин: життєздатність становила на 3-ю добу 51 ± 9 %. Однак подовження терміну гіпотермічного зберігання у культуральному середовищі до 7 днів призводило до загибелі практично усіх МСК як в суспензії, так і у складі АМС.

Використання як середовищ зберігання розчинів UW і ССР дозволило значно покращити ефективність гіпотермічного зберігання. За 3 доби зберігання зміни в життєздатності клітин були незначними, а після 7-и днів зберігання у ССР і UW життєздатність МСК як в суспензії, так і у складі АМС, хоч і значимо знижувалася, але залишалася у межах від 56 ± 9 % до 76 ± 6 %.

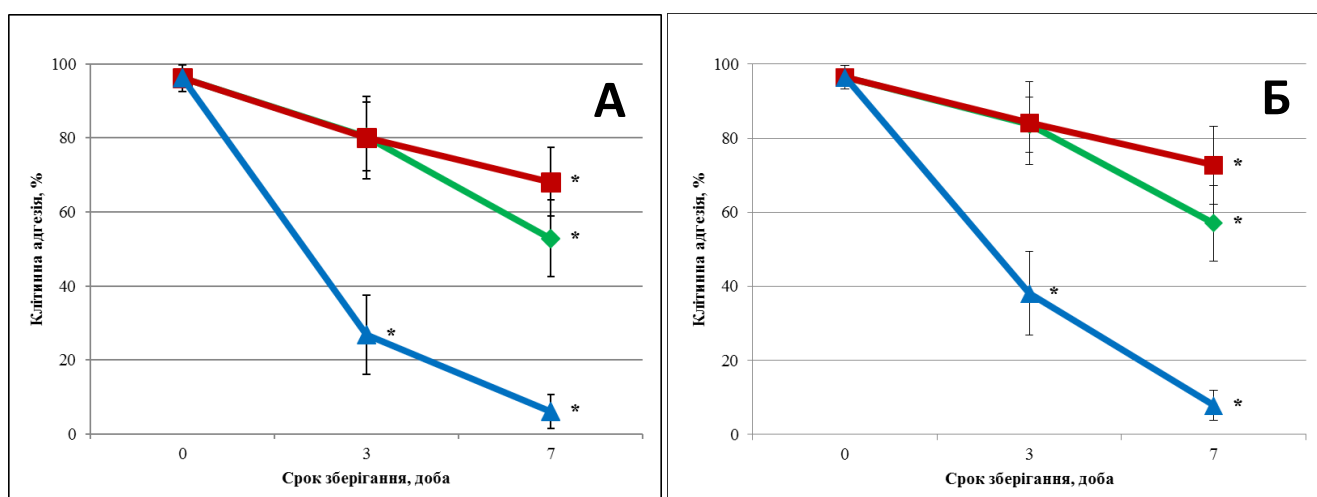


Рис. 5.7. Здатність до адгезії МСК після зберігання у вигляді суспензії (А) та у складі АМС (Б) за 4 °С у середовищах ССР (◆), UW (■) та культуральному середовищі (▲) за МТТ-тестом.

Примітка: Відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем (*).

Аналогічні дані були отримані при оцінці здатності МСК прикріплятися до культурального пластику після зберігання (рис. 5.7.). Після 3-х діб гіпотермічного зберігання у КС тільки 27 ± 10 % клітин у суспензії та 38 ± 10 % інкапсульованих МСК мали здатність прикріплятися до поверхні культурального пластику, тоді як при застосуванні консервуючих розчинів спостерігалася лише тенденція до зниження даного показника. Після 7-ми діб гіпотермічного зберігання у КС кількість клітин, здатних до адгезії, не перевищувала 5 % в разі зберігання як у вигляді суспензії, так і у складі АМС. При застосуванні розчинів ССР і UW клітини зберігали високу здатність прикріплятися до культурального пластику незалежно від форми зберігання: від 53 ± 10 % до 73 ± 11 % клітин.

На рис. 5.8. представлені дані щодо здатності клітин, що зберігалися у суспензії і у складі АМС, відновлювати АВ після 1-ї доби моношарового культивування. Видно, що після гіпотермічного зберігання у розчинах ССР і UW протягом 3-х діб метаболічна активність МСК практично не відрізнялася від контролю, тоді як гіпотермічне зберігання у культуральному середовищі призводило до значного зниження цього показника.

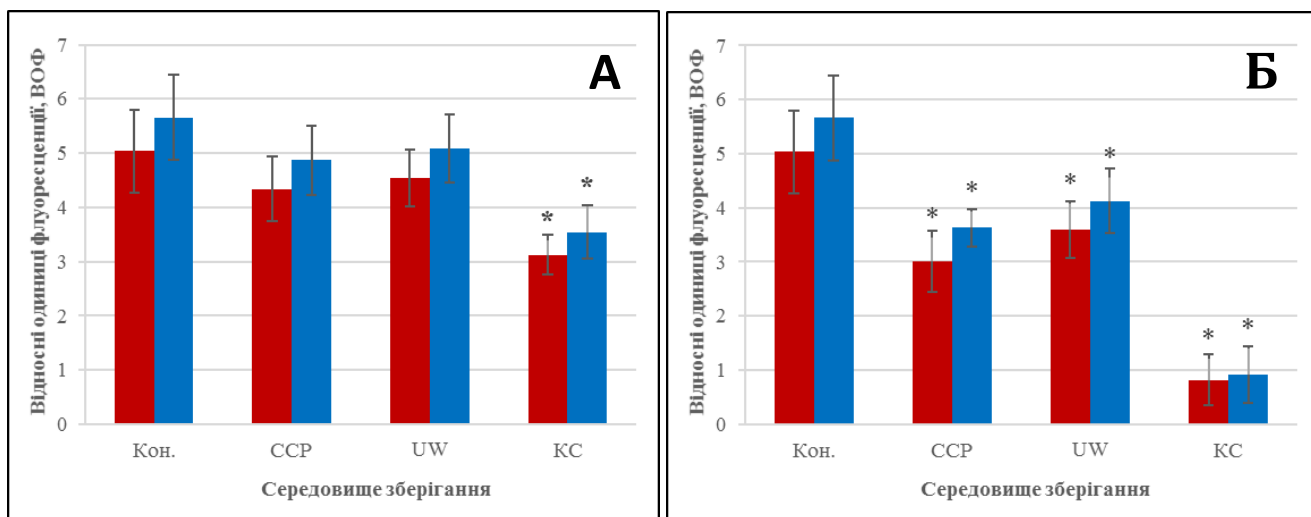


Рис. 5.8. Метаболічна активність за АВ-тестом культур МСК, отриманих після 3-х (А) і 7-ми (Б) діб гіпотермічного зберігання клітин у вигляді суспензії (■) і у складі АМС (■) в середовищах ССР, UW і КС (2-а доба моношарового культивування).

Примітка: Відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем (*).

Після 7-и діб гіпотермічного зберігання (рис. 5.8 Б) втрати здатності МСК відновлювати АВ була значними при застосуванні усіх обраних розчинів. Але різниця в збереженості данного показника між консервуючими розчинами та КС була істотною: при застосуванні консервуючих розчинів метаболічна активність культур була не нижче 50 % від контролю, а при використанні КС – лише 15 %.

Слід зазначити, що істотних відмінностей у відновленні АВ клітинами, що зберігалися у суспензії і у складі АМС, виявлено не було.

Задля підтвердження здатності до мультилінійного диференціювання МСК після гіпотермічного зберігання вміщувалися в умови моношарового культивування за присутності відповідних індукторів. На рис. 5.9. представлений типовий результат спрямованого адипогенного диференціювання МСК. Клітини після гіпотермічного зберігання у АМС протягом 3-х і 7-ми діб у розчинах ССР і UW при культивування характеризувалися накопиченням внутрішньоклітинних ліпідних крапель, які позитивно забарвлювалися барвником Oil Red O в рожево-червоний колір, що свідчить про адипогенне диференціювання клітин. За

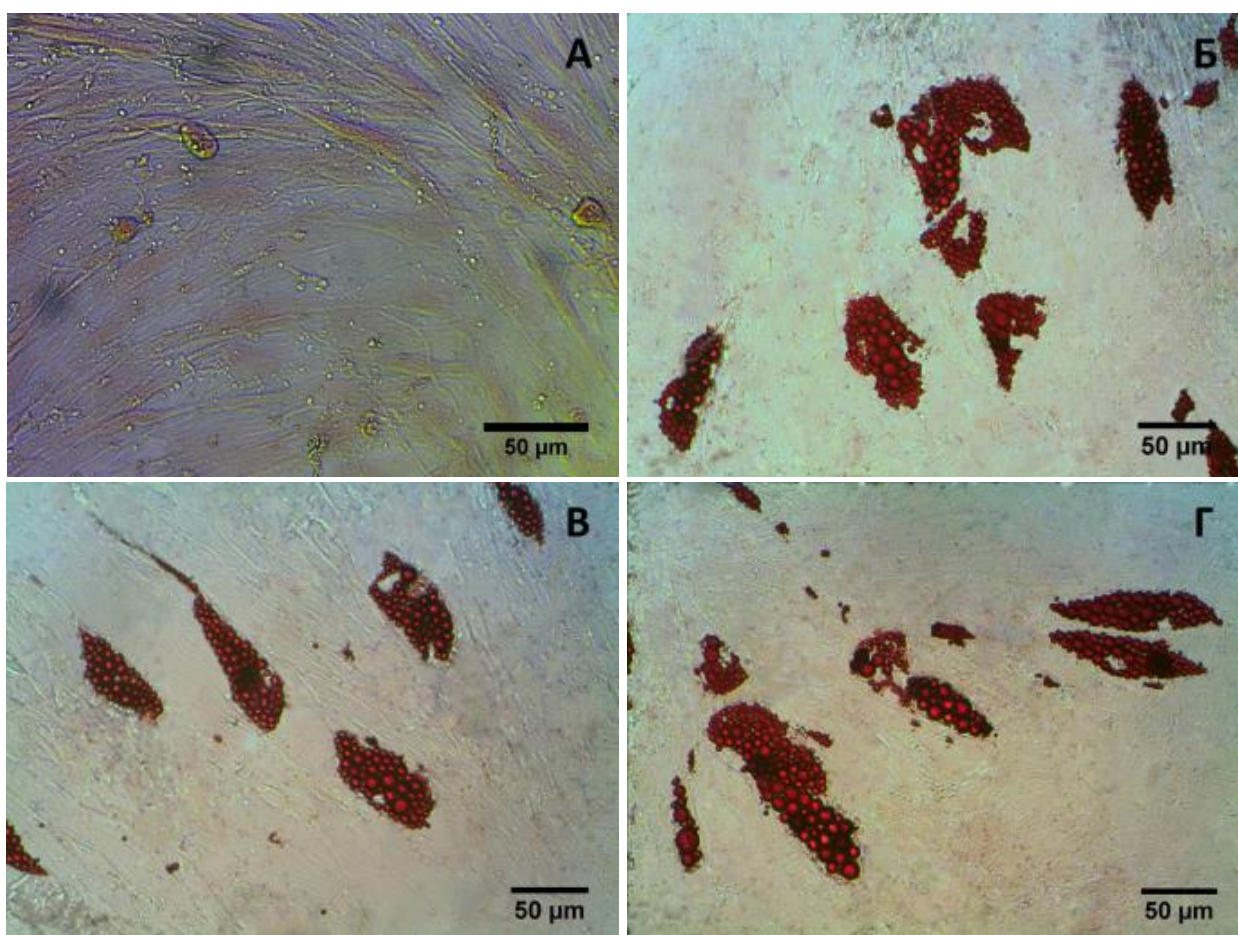


Рис. 5.9. Виявлення адипогенного диференціювання в культурах МСК, отриманих з клітин, що не піддавалися зберіганню (Б) та після гіпотермічного зберігання протягом 3-х (В) та 7-и (Г) діб у середовищах ССР і UW, за відсутності (А) та в присутності індукторів адипогенного диференціювання (Б-Г). Типове зображення; забарвлення Oil Red O.

морфологією і інтенсивністю забарвлення клітини, що пройшли гіпотермічне зберігання, практично не відрізнялися від контрольних.

Після гіпотермічного зберігання у середовищах ССР і UW протягом 3-х і 7-ми діб МСК також зберігали здатність до диференціювання в остеогенному напрямку (рис. 5.10.). При культивуванні клітин у присутності відповідних індукторів спостерігалось накопичення мінералізованого матриксу, що приводило до забарвлення зразків Alizarin Red S у червоний колір.

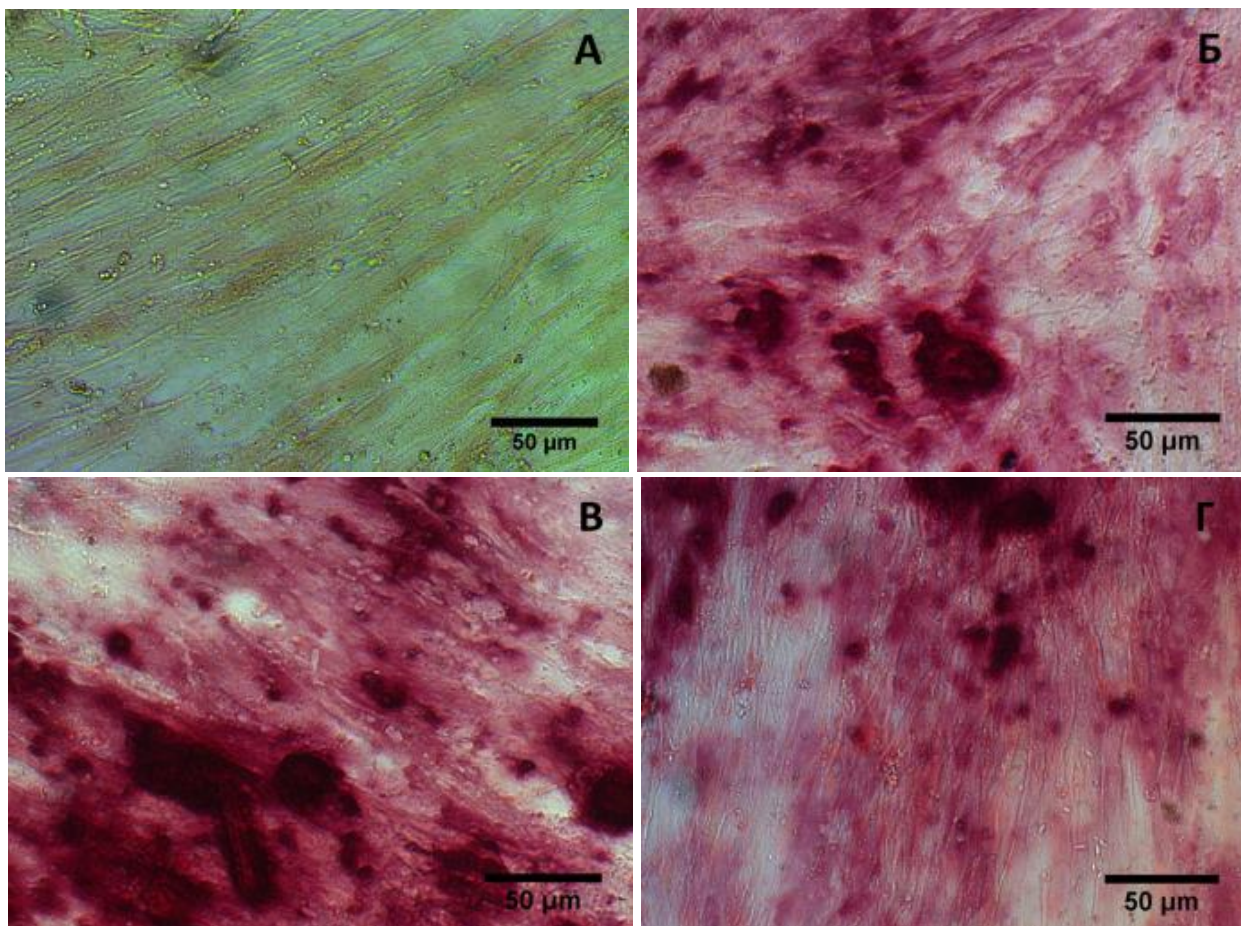


Рис. 5.10. Виявлення остеогенного диференціювання в культурах МСК, отриманих з клітин, що не піддавалися зберіганню (Б) та після гіпотермічного зберігання протягом 3-х (В) та 7-и (Г) діб у середовищах ССР і UW, за відсутності (А) та в присутності індукторів адипогенного диференціювання (Б-Г). Типове зображення; забарвлення Alizarin Red S.

У клітинах, що культивувалися в середовищі без додавання індукторів, накопичення продуктів диференціювання не спостерігалось. Здатність клітин до спрямованого диференціювання в умовах моношарового культивування свідчить на користь їхньої функціональної повноцінності.

Оскільки необхідність у мезенхімальних стромальних клітинах для лікування різноманітних захворювань людей продовжує зростати, необхідність ефективних та клінічно безпечних методів їх транспорту також буде зростати.

Хоча кріоконсервування, безумовно, є найкращим із сучасних методів для тривалого збереження клітин, проте його недоліки штовхають дослідників до пошуку альтернатив. Встановлено, що кріоконсервування призводить до пошкодження клітинної мембрани та активації апоптозу [268, 269]. Крім того, кріоконсервування є трудомістким методом та вимагає злучення кваліфікованого персоналу, так само як використання спеціалізованого обладнання та речовин, які не підходять для використання у клінічній практиці, наприклад рідкий азот, що не відповідає GMP (Good Manufacturing Practice). Для того, щоб подолати ці проблеми, на сьогодні вже пропонуються досить складні альтернативи, що здатні підтримувати заморожені клітини за умови їх транспортування. Незважаючи на те, що ці підходи залишаються у розробці, актуальним залишається пошук більш дешевого, простого надійного методу збереження клітин для транспортування. Використання гідрогелів як клітинних носіїв для доставки клітин все частіше запропоновується у якості альтернативи звичайним методам кріоконсервування [270, 271].

Було показано, що макро- та мікроструктуру альгінатного гідрогелю можна модифікувати для підтримки короткострокового збереження епітеліальних клітин роگیрки [193]. Використання більш складного композиту, що включав альгінат-стронцієвий гель та нейлонову сітку, дозволило запропонувати ще один надійний спосіб зберігання і транспортування як МСК за позитивних температур, без використання спеціалізованих розчинів [84]. Результати, отримані у даній роботі добре узгоджуються із цими спостереженнями. Проте, запропоноване у дисертаційній роботі використання альгінатного гідрогелю саме у формі альгінат-кальцієвих мікросфер є більш простим та дешевим підходом, при цьому ефективність зберігання клітин не поступається іншим запропонованим методам. При цьому слід враховувати, що використання АМС можна вважати більш доцільним, оскільки сферична форма забезпечує однакові умови для усіх клітин у складі гідрогелю. Використання іншої форми гідрогелю може призводити до нерівномірності розподілу речовин між клітинами що знаходяться у різних шарах гідрогелю, призводячи до додаткового порушення функціонального стану клітин.

Одже, одержані у даній роботі результати підтвердили, що альгінатний гідрогель у формі мікросфер добре підходить у якості носія МСК.

Відомо, що альгінатні гідрогелі утворені за рахунок використання кальцію є досить еластичними та не дуже стабільними у проміжку довгострокового культивування, одже за агітації інкапсульовані клітини можуть вивільнитися з гідрогелю, що безперечно може призвести до їх загибелі. Можна припустити, що транспортування клітин може викликати значну агітацію гідрогелю, що призведе до порушення його цілісності. Щоб уникнути можливої фрагментації альгінатного гідрогелю за умови транспортування, було запропоновано використання стронцію у якості зшиваючого агенту. Було виявлено, що стронцій володіє більшою спорідненістю до альгінату, ніж кальцій, внаслідок чого альгінатні гідрогелі можуть мати поліпшену стійкість до механічних пошкоджень внаслідок агітацій [101]. Альгінатні гідрогелі із стронцієм були успішно використані у інженерії кісткової тканини [272, 273]. Слід зазначити, що для використання стронцію у якості зшиваючого агенту необхідно використовувати лише альгінати з високим вмістом G, при цьому значним переваг у стронційових гідрогелів із альгінату з високим вмістом M зазвичай не спостерігається. Використання стронцію також ускладнює підход короткострокового зберігання клітин. За умови транспортування, що зазвичай не перевищує 5-х діб, використання кальцію у якості зшиваючого агенту досить доцільне та практичне. У даній дисертаційній роботі впродовж зберігання клітин не було виявлено порушень цілісності альгінатного гідрогелю, а на кінцевий період спостереження АМС все ще залишалися досить стабільними та жорсткими, перемишування та механічні коливання не порушували їх цілісності. Цій стабільності АМС також може сприяти сферична форма, оскільки саме сферична форма є більш стабільною до розривів чи інших пошкоджено гідрогелю у порівнянні до пластинчастої чи дископодібної форми. Одже, використання кальцій-альгінатного гідрогелю у формі мікросфер є досить сприятливим та оптимальним підходом для транспортування клітин, не призводячи до порушення цілісності самого гідрогелю у перебігу короткострокового зберігання.

Відомо, що альгінатний гідрогель ефективно використовувався у якості носія для стовбурових клітин, з метою лікування дефектів нервової та кісткової тканин у зоні хребта [274, 275]. Однак здатність альгінату зберігати стовбурові клітини в недиференційованому стані впродовж певного періоду часу стало відомо досить нещодавно і має вирішальне значення у галузі регенеративної медицини. Показано, що ключові маркери МСК були позитивними після екстракції з альгінатних гелів, навіть після 5 днів утримання у гідрогелі [84]. Ці спостереження узгоджуються з результатами інших досліджень, у яких досліджували альгінатні гідрогелі із інкапсульованими ЕСК людини. Так, ЕСК у складі кальцій-альгінатного гідрогелю (1,1 %) за умови культивування у стандартних умовах впродовж 260 днів, зберігали свою плюрипотентність [276], а культивування клітин у складі альгінат-хітозанового гідрогелю додатково підтвердило збереження їх здатності до самовідновлювання після тривалого культивування [277]. Цікаво, що ЕСК після кріоконсервування у складі АМС також зберігають свій фенотип стовбурових клітин [254]. Тому, здатність альгінатного гідрогелю підтримувати специфічні властивості клітин є ще однією перевагою при його використанні у якості підтримуючого матеріалу за умови розробки методів транспортування чи короткострокового зберігання клітин. Проте, слід враховувати що всеж таки відповідь клітин на утримання у АМС може відрізнятись для різних типів клітин, тому оптимізація умов транспортування клітин у складі альгінатного гідрогелю повина бути виконана для кожного певного типу клітин. Суперечачи попереднім цитуваннями, було також показано що культивування МСК у складі АМС може призводити до стимуляції остеогенного чи хондрогенного диференціювання цих клітин [277–280]. Проте, за отриманими результатами даного дослідження та спостереженнями, показали що за умови зберігання при позитивних температур у складі АМС, альгінатний гідрогель запобігає спонтанному диференціюванню МСК, а після вивільнення клітин вони здатні до активної проліферації та подальшого спрямованого диференціювання.

Було повідомлено, що за результатами проточної цитометрії спостерігалася різниця у експресії Oct-3/4 та SSEA-4 між нативними МСК та МСК після 10 днів культивування у вигляді моношару, тоді як у порівнянні до клітин, що культивувалися у складі АМС спостерігалися лише дуже незначні відмінності [84]. Заморожування може спричинити втрату вторинної та третинної структури білків, що безпосередньо вплине на ключові маркери МСК [281, 282]. Дослідники припускають, що ймовірно ці білки більш сприйнятливі до денатурації під час заморожування або відігрівання, але при оптимальних умовах культивування нормальний стан може повернутися після 10 днів. За результатами QPCR також було показано трикратне збільшення експресії Oct-3/4 та SSEA-4 після зберігання клітин у складі альгінатного гідрогелю, що є досить важливим для подальшого відновлення проліферативної активності стовбурових клітин [283].

Життєздатність екстрагованих із АМС клітин складала після зберігання за позитивних температур (22 чи 37 °C) впродовж 3 діб складала не менше 70 %, що узгоджується з даними, отриманими для зберігання епітеліальних клітин рогатої худоби за подібних умов [84]. Проте, утримання клітин за гіпотермічних умов призводило до загибелі їх більшої частини. Виходячи з отриманих даних, причиною загибелі клітин у культуральному середовищі за гіпотермічного зберігання слід, ймовірно, вважати порушення іонного балансу внаслідок зниженої активності Na^+ - K^+ -насоса. Потік позаклітинних речовин (а найбільш іонів Na^+ і Cl^-) всередину клітин порушує осмотичну рівновагу в системі клітина-навколишнє середовище, призводить до набухання клітин і, таким чином, їхньої загибелі. Використання консервуючих середовищ UW і SSP, які містять замість хлористого натрію непроникаючі у клітину речовини (сахароза і ПЕГ-800 - у SSP; лактобінат і рафіноза - у UW), дозволяє підтримати осмотичну рівновагу між клітиною і навколишнім середовищем, що сприяє збереженню життєздатності МСК на високому рівні впродовж 7-и діб гіпотермічного зберігання. Важливо відзначити, що клітини як у суспензії, так і у складі АМС після гіпотермічного зберігання у середовищах UW і SSP залишаються морфологічно, метаболічно і функціонально повноцінними - при поверненні у близькі до фізіологічних умови

моношарового культивування вони розпластуються, проліферують і демонструють здатність до індукованого диференціювання в остеогенному і адипогенному напрямках.

Одже, це технічне дослідження дає докази того, що МСК людини можуть бути іммобілізовані у альгінатний гідрогель сферичної форми з використанням кальцію у якості зв'язувального агенту, при цьому клітини зберігаються протягом тривалого періоду часу за позитивних температур з використання культурального середовища, або спеціалізованих середовищ гіпотермічного зберігання. Більш важливим є те, що подальше легке вилучення цих клітин з високим рівнем життєздатності та підтримкою їх специфічних властивостей дозволяє запропонувати новий і простий спосіб транспортування клітин як для клінічного застосування, так і для дослідницьких цілей.

Матеріали розділу 5 опубліковані в роботах [246–248, 267, 284–290].

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Інкапсуляція клітин у мікросфери із природних чи синтетичних гідрогелей знаходить все більш широке застосування в біотехнології, тканинній інженерії, трансплантології, а також при вирішенні низки теоретичних завдань клітинної біології. Матеріали для інкапсуляції повинні володіти низькою токсичністю, здатністю до формування певних фізико-хімічних структур, що забезпечує іммобілізацію клітин, транспорт до них поживних речовин і виведення продуктів розпаду, а також підтримувати життєздатність та функціональну активність клітин при культивуванні. У даній роботі у якості матеріалу для отримання мікросфер використовувався альгінат, адже він характеризується природним походженням, здатен утворювати пористий гідрогель за присутності розчинів двовалентних катіонів у фізіологічних умовах, володіє певною механічною міцністю, биосумісністю і здатністю деградувати без утворення токсичних продуктів. Також, він дозволяє дифундувати кисню, живильних речовинам, сигнальним молекулам, але перешкоджає дифузії молекул з молекулярною масою понад 100 кДа.

На сьогоднішній день, такі властивості альгінатних гідрогелей обумовили його використання у якості носія для багатьох різних клітин та структур. Проте найбільш перспективною та широкозастосовуваною клітинною складовою біоінженерних конструктів є мезенхімальні стромальні клітини, які характеризуються унікальною здатністю до самовідновлення і мультилінійного диференціювання. Однак до теперішнього часу не розроблено універсального та стандартизованого протоколу укладення клітин в альгінатні мікросфери. Особливості інкапсуляції МСК і їх властивості при культивуванні у складі мікросфер також залишаються маловивченими.

Натепер найбільш ефективним і перспективним методом формування гідрогелевих мікросфер вважається метод електророзпилення. Відповідно до нього діаметр утворюваних крапель при розпиленні рідкого гелеутворювача

залежить від величини накладеного електростатичного потенціалу, що на практиці забезпечується застосуванням генератора високої напруги.

У даній роботі було розроблено та оптимізовано систему для отримання АМС, що включала шприцевий інфузійний насос, шприц для гелеутворювача об'ємом 1 мл з тупокінцевою голкою діаметром 0,33 мм, ємність для гелюючого розчину і генератор з функцією регульованої подачі напруги від 0 до 7 кВ. При вільному падінні крапель альгілату у гелюючий розчин CaCl_2 формувалися мікросфери діаметром близько 2000 мкм. Подання навіть незначної напруги зменшувало розмір АМС до 1500 мкм, поступове збільшення напруги супроводжувалося подальшим зменшення діаметра крапель до 200 мкм і формуванням правильного конусу розпилення, причому зменшення діаметра АМС корелювало з ростом напруги. Значущими для процесу отримання мікросфер певного розміру та форми були також такі параметри системи як відстань між місцем формування крапель (голкою) та гелюючим розчином, швидкість вивільнення гелеутворювача, форма кінчика голки.

Було встановлено, що основним параметром, який визначає форму одержуваних із застосуванням електророзпилення АМС, є концентрація розчинів гелеутворювача і гелюючого агента: альгілату натрію і хлористого кальцію. Найбільш стабільні мікросфери правильної сферичної форми і з гладкою поверхнею утворювалися за використання 2,0 %-го альгілату натрію за умови його полімеризації у 2,0 %-му розчині хлористого кальцію.

Визначені параметри роботи системи, а саме: подана напруга ≤ 7 кВ, відстань від кінчика голки до поверхні гелюючого розчину 4 см, швидкість вивільнення альгілату зі шприца 10 мл/годину, тупокінцева форма голки, концентрація розчину альгілату натрію 2,0 %; концентрація розчину CaCl_2 2,0 %, – забезпечили отримання АМС фіксованого діаметру в діапазоні 200–800 мкм з відхиленням в межах 7 %.

При отриманні АМС із вміщеними МСК останні по закінченню полімеризації візуалізувалися у товщі прозорого гідрогелю як одиночні відокремлені одна від одної клітини, розташовані рівномірно по всьому об'єму

АМС. Абсолютна більшість клітин в АМС при комбінованому фарбуванні ФДА/ЕБ демонстрували зелену флуоресценцію, характерну для життєздатних клітин. За МТТ-тестом життєздатність МСК у складі АМС становила 94 ± 3 % при вихідній життєздатності клітин до інкапсуляції 96 ± 2 %. Культивування МСК у складі АМС протягом 7 діб не призводило до зміни їхньої морфології та достовірного зниження життєздатності. Це дозволяє зробити висновок, що визначені у даній роботі умови отримання мікросфер із застосуванням електророзпилення не чинять негативного впливу на клітини в перебігу самої процедури інкапсуляції.

Ідентифікаційними характеристиками МСК, що були визначені для моношарової культури цих клітин, є фібробластоподібна морфологія, адгезивність, специфічний імунофенотип та наявність проліферативного і диференціовального потенціалів. Дослідження з об'ємними макропористими носіями, біосумісними з МСК, такими, наприклад, як обрані нами модифіковані скелети морської губки *Ianthella basta*, показали, що специфічні властивості МСК реалізуються і в умовах тривимірного культивування. Однак МСК, що проходили об'ємне культивування в товщі гідрогеля АМС, отриманих з 2 %-го альгінату натрію, не розпластувалися і не проліферували.

Порівняльне дослідження виявило, що метаболічна активність МСК у складі АМС майже на 30 % нижча за рівень метаболічної активності клітин у моношарі: рівні утворення формагану з МТТ і відновлення АВ становили для МСК у складі АМС $0,44\pm 0,01$ умовних одиниць абсорбції (УОА) та $2530,6\pm 151,7$ умовних одиниць флуоресценції (УОФ), відповідно, тоді як моношарові культури МСК характеризувалися показниками $0,64\pm 0,02$ УОА та 3531 ± 96 УОФ.

За допомогою катіонного карбоціанінового барвника JC-1 були виявлені відмінності у мембранному потенціалі мітохондрій МСК в залежності від умов їх перебування. Клітини в моношарі демонстрували більш виражену флуоресценцію у червоно-помаранчевій області, що притаманна J-агрегатам барвника, які утворюються у клітинах з високим мембранним потенціалом мітохондрій $\Delta\psi_m$. У складі АМС, навпаки, більшість клітин мали зелену флуоресценцію, тобто

характеризувалися низьким $\Delta\psi_m$. Кількісна оцінка спектрофлуориметричним методом підтвердила мікроскопічні спостереження: для МСК у складі АМС були характерними високі показники відносних одиниць флуоресценції (ВОФ) у зеленій області - $0,566 \pm 0,051$, у той час як інтенсивність флуоресценції у червоно-помаранчевої області складала лише $0,277 \pm 0,067$ ВОФ. Для МСК у вигляді моношару, навпаки, в зеленій області показники флуоресценції мали нижчий рівень, ніж у червоно-помаранчевій: $0,387 \pm 0,019$ та $0,564 \pm 0,020$ ВОФ, відповідно.

Таким чином, інкапсульовані в АМС МСК характеризувалися зниженням загальної метаболічної активності та мембранного потенціалу мітохондрій, а також відсутністю адгезивної та проліферативної активностей, які є досить енерговитратними процесами.

Означені відмінності мали оборотний характер: після вивільнення з АМС і переведення в умови моношарового культивування 85 ± 4 % клітин прикріплялися до адгезивної поверхні і були здатні до проліферації. На третю добу культивування на культуральному пластику клітини формували суцільний рівномірний моношар, а показник АВ-теста зростав втричі: 5766 ± 122 УОФ порівняно з 1532 ± 160 УОФ на першу добу.

Вивільнені з АМС МСК виявляли здатність до індукованого диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямках, що підтверджувалося накопиченням відповідних продуктів диференціювання в моношарових культурах. Істотних відмінностей між контрольними культурами та клітинами, що були піддані інкапсуляції в АМС при цьому виявлено не було.

Таким чином, проведені дослідження показали, що визначена процедура отримання АМС, що містять МСК, за допомогою електророзпилення не чинить негативного впливу на ідентифікаційні характеристики МСК, а блокування проліферації і зниження метаболічної активності клітин у складі АМС мають оборотний характер і є обмеженням реалізації потенціалу МСК, а не втратою клітинами відповідних властивостей.

Тривале зберігання клітин та тканиноінженерних конструкцій є невід'ємним етапом сучасних технологій в медико-біологічній галузі. Раніше в нашій

лабораторії було показано, що високу збереженість МСК, інкапсульованих в АМС, може забезпечити програмне повільне двоетапне заморожування у присутності ДМСО за умов залучення ініціації кристалоутворення та використання в кріозахисному розчині не менше 10 % ДМСО. Відмінність за розміром та технологією отримання АМС, застосованих у попередніх дослідженнях, зумовила необхідність проведення подальших досліджень щодо кріоконсервування АМС з МСК. При цьому нами була здійснена спроба залучити попереднє теоретичне обґрунтування і математичний розрахунок до вибору найбільш ефективного режиму заморожування для даного конкретного об'єкта. Крім того, ми намагалися отримати високі показники збереженості клітин за меншої концентрації кріопротектора.

Визначення динаміки змін об'єму МСК при експозиції їх в 1 М ДМСО показало, що осмотична реакція МСК на таку концентрацію кріопротектора (швидка дегідратація та подальша повільна регідратація) як в суспензії, так і в АМС повністю завершувалася до 5-ї хвилини експозиції і не супроводжувалася помітними порушеннями клітинної цілісності, однак дегідратація МСК у складі АМС відбувалася повільніше. Експериментально визначені відносні об'єми МСК у різні моменти періоду перебування клітин в 1 М розчині ДМСО, а також отримано на їхній основі теоретичні криві залежності зміни клітинного об'єму від тривалості контакту з кріопротектором. Розрахунок з використанням фізико-математичної моделі показав, що теоретична крива коректно описує експериментальні дані для МСК у вигляді суспензії за коефіцієнтів проникності мембран для молекул води $L_p = (3,38 \pm 1,1) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$ і ДМСО $K_1 = (1,60 \pm 0,21) \times 10^{-8} \text{ м/с}$, а для МСК у складі АМС – за $L_p = (2,03 \pm 1,4) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$ і $K_1 = (1,07 \pm 0,18) \times 10^{-8} \text{ м/с}$. Означені відмінності цих характеристик для інкапсульованих клітин, ймовірно, є наслідком уповільнення дифузії кріопротектора у товщу альгінатного гідрогелю, і, отже, поступового зростання концентрації кріопротектора безпосередньо біля самих клітин, а також розведення за рахунок утримуваної всередині АМС води.

Підставляючи отримані коефіцієнти проникності до фізико-математичної моделі, що описує кінетику змін відносного об'єму клітин у процесі позаклітинної кристалізації за певної швидкості охолодження, можна спрогнозувати ступінь зневоднення МСК. Прогнозоване зневоднення МСК, які заморожували зі швидкостями від 0,5 до 20 °С/хв до -40 °С відрізняється для клітин у суспензії та у складі АМС: за швидкості охолодження 0,5 °С/хв розрахований відносний об'єм МСК у вигляді суспензії дорівнював 0,49, а у складі АМС - 0,57; за швидкості 1 °С/хв - 0,62 та 0,74, відповідно. Слід зазначити, що більші швидкості охолодження (від 10 °С/хв) не забезпечують достатнього зневоднення клітин, що може в результаті призвести до внутрішньоклітинної кристалізації і загибелі клітин у процесі заморожування.

Проведені експерименти по заморожуванню суспензій МСК та АМС з МСК у кріозахисному середовищі з 1 М ДМСО показали достовірність зроблених висновків. Охолодження зі швидкостями 10 та 20 °С/хв призводило до загибелі близько 80 % клітин як у складі суспензії, так і у складі АМС. Кріоконсервування за низьких швидкостей охолодження (0,5 та 1 °С/хв) не порушувало цілісність АМС, а життєздатність клітин зберігалася на рівні 75 % і вище. Найвищі значення життєздатності були отримані за швидкості охолодження 1 °С/хв: 88±4 % для суспензій клітин та 81±4 % для клітин у складі АМС. Однакові значення життєздатності МСК, кріоконсервованих у вигляді суспензії і у складі АМС, були отримані при зниженні швидкості охолодження до 0,5 °С/хв.

З метою оцінки можливості застосування технології інкапсуляції для короткострокового зберігання та транспортування клітин було проведено порівняльне вивчення структурно-функціонального стану та здатності до індукованого диференціювання МСК, що перебували за позитивних температур (4, 22, 37 °С) у вигляді суспензії або у складі АМС.

Зберігання МСК у культуральному середовищі за температур 4, 22 та 37 °С. Зберігання суспензій МСК в культуральному середовищі за усіх обраних температур супроводжувалося поступовим зниженням їхньої життєздатності починаючи вже з 1-ї доби, маючи наслідком значну втрату життєздатних клітин

наприкінці спостереження, на 3-ю добу. Найбільш вираженим зниження життєздатності було в разі зберігання при 4 °С – до 30 %. Інкапсульовані в АМС МСК краще переживали короткострокове зберігання, достовірні відмінності після 1-ї доби зберігання і надалі, впродовж усього періоду спостереження, були відзначені тільки у разі зберігання за 4 °С. За температури 22°С достовірне зниження показника відзначалося лише на кінець експерименту, а зберігання інкапсульованих МСК при 37 °С не призводило до зниження життєздатності впродовж 3-х діб ($87\pm 9\%$).

Подібні зміни спостерігалися при визначенні здатності клітин до адгезії: в перебігу зберігання суспензій МСК відбувалося поступове зниження їхньої здатності адгезувати до підложки; МСК, які проходили етап зберігання за 22 та 37 °С у складі АМС, значно більшою мірою зберігали свої адгезивні властивості, ніж клітини в суспензії; переваг інкапсульованих клітин над клітинами у суспензії в разі гіпотермічного зберігання за 4 °С не виявлялося.

Аналіз метаболічної активності культур МСК, що були отримані після зберігання за позитивних температур у культуральному середовищі виявив, що тільки культури МСК, що зберігалися у складі АМС за 22 і 37 °С, мали показники АВ-тесту на рівні контролю – $4,04\pm 0,56$ - $4,24\pm 0,52$ ВОФ незалежно від терміну зберігання.

Дослідження диференціювальних властивостей показало, що МСК людини після перебування у складі АМС у культуральному середовищі за різних позитивних температур зберігають здатність до індукованого диференціювання у остеогенному та адипогенному напрямках.

Таким чином, інкапсуляція у АМС дозволяє подовжити терміни безпечного зберігання МСК у культуральному середовищі за позитивних температур 22 і 37 °С: перебуваючи у складі АМС, клітини більшою мірою зберігають життєздатність, здатність прикріплюватися до культурального пластику, метаболічну активність за АВ-тестом та диференціювальний потенціал, ніж за зберігання у вигляді суспензії.

Виявлене зниження показників функціонального стану МСК при зберіганні за 4 °С може бути обумовлене складом обраного середовища зберігання, а саме середовища для культивування, коли клітини здатні підтримувати осмотичний і іонний гомеостаз за рахунок власного метаболізму. Для забезпечення більш тривалих термінів гіпотермічного зберігання клітин застосовують спеціалізовані середовища, серед яких найбільш відомим є розчин UW. Розроблений у відділі кріобіохімії ІПКіК НАН України сахарозо-сольовий розчин також є досить ефективним для гіпотермічного зберігання біоб'єктів і, у той же час, більш економічно вигідним.

Гіпотермічне зберігання за 4 °С суспензії МСК у культуральному середовищі призводило до зниження їхньої життєздатності до 33 ± 10 % вже на 3-ю добу. Інкапсуляція у АМС частково запобігала загибелі клітин і життєздатність становила 51 ± 9 %. Застосування розчинів UW і ССР дозволяло зберегти життєздатність на цей строк практично на контрольному рівні. Подовження терміну зберігання в культуральному середовищі до 7-и діб призводило до загибелі майже усіх МСК як у суспензії, так і у складі АМС. В разі використання розчинів UW та ССР життєздатність МСК як у вигляді суспензії, так і у складі АМС достовірно знижувалася, проте залишалася на досить високому рівні (від 56 ± 9 % до 76 ± 6 % для різних груп спостереження).

Гіпотермічне зберігання у культуральному середовищі призводило до значних втрат здатності МСК до адгезії. Залучення спеціалізованих розчинів істотно уповільнювало цей процес, дозволяючи зберегти даний показник на рівні не нижчому за 50 % на 7-му добу експерименту, причому відмінностей у досліджуваних властивостях між клітинами в суспензії та клітинами в АМС виявлено не було.

Метаболічна активність за АВ-тестом МСК, що пройшли етап гіпотермічного зберігання в культуральному середовищі, була істотно нижчою за контрольний рівень на обидва строки спостереження. Застосування розчинів UW та ССР значною мірою запобігало втраті метаболічної активності: після 7-ми діб

зберігання показники АВ-теста зменшувалися лише на 40-30 % до контролю. Різниця між показниками для клітин в суспензії і у складі АМС була відсутня.

МСК, що пройшли етап гіпотермічного зберігання у розчинах UW та ССР у складі АМС, мали здатність до індукованого диференціювання у остеогенному та адипогенному напрямках.

Таким чином, МСК у складі АМС після гіпотермічного зберігання впродовж 7-х діб у середовищах UW та ССР залишаються морфологічно, метаболічно та функціонально повноцінними. При поверненні клітин в умови моношарового культивування вони прикріплюються, набувають фібробластоподібного вигляду, активно проліферують та виявляють здатність до індукованого диференціювання у адипо- та остеогенному напрямках.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведені теоретичне узагальнення і вирішення наукової проблеми низькотемпературного консервування та гіпотермічного зберігання МСК у складі АМС фіксованого розміру та форми, отриманих за допомогою методу електророзпилення.

1. Доведено, що процес отримання стабільних та однорідних за формою і розміром АМС, що містять МСК, із застосуванням методу електророзпилення з використанням напруги ≤ 7 кВ, не впливає на життєздатність інкапсульованих клітин.
2. МСК у складі АМС розміром близько 200 мкм, які утворені із 2 %-го розчину альгінату під дією 2 %-го розчину хлористого кальцію із залученням електророзпилення, в умовах культивування демонструють зниження на 30 % загальної метаболічної активності клітин, дослідженої за допомогою МТТ- та Alamar Blue-тестів, та зниження мембранного потенціалу мітохондрій порівняно з клітинами у моношаровій культурі. МСК в АМС демонструють сферичну форму, не мають міжклітинних контактів, не проліферують, однак здатні тривалий час підтримувати свою життєздатність на високому рівні.
3. Встановлено, що зміни метаболічно-функціонального стану МСК, інкапсульованих в АМС, носять оборотний характер. МСК, вилучені зі складу АМС, здатні до адгезії, проліферації та індукованого мультилінійного диференціювання в умовах моношарового культивування.
4. На основі експериментально визначеної осмотичної відповіді МСК в суспензії або у складі АМС з діаметром 200 мкм на 1 М розчин ДМСО з залученням математичного моделювання були розраховані коефіцієнти проникності для води та кріопротектору. З'ясовано, що осмотична реакція МСК у складі АМС уповільнена у порівнянні з відповіддю клітин у суспензії.

5. Із залученням розрахованих коефіцієнтів проникності цитоплазматичних мембран МСК для води та ДМСО були теоретично визначені швидкості охолодження до $\square 40$ °С у присутності 1 М ДМСО, при яких забезпечується дегідратація клітин, достатня для запобігання ушкоджень, пов'язаних із внутрішньоклітинною кристалізацією. Експериментально доведено, що кріоконсервування МСК у складі АМС під захистом 1 М ДМСО зі швидкостями охолодження 0,5 і 1 °С/хв забезпечує високу збереженість клітин.
6. Виявлено, що інкапсуляція у АМС сприяє збереженню життєздатності, адгезивних властивостей та метаболічної активності МСК за умов короткострокового зберігання у культуральному середовищі за температур 22 та 37 °С до 3-х діб на рівні 80-90 %. Зберігання у культуральному середовищі за температури 4 °С призводить до зниження життєздатності МСК як у суспензії, так і в складі АМС.
7. Встановлено, що гіпотермічне зберігання при температурі 4 °С в розчинах ССР та UW дозволяє отримати високі показники збереження МСК як в суспензії, так і у складі АМС впродовж 7-и діб. При поверненні в умови моношарового культивування МСК, що зберігалися у середовищах ССР та UW протягом 7-и діб, були здатні до проліферації та індукованого диференціювання у адипо- та остеогенному напрямках.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Paredes Juárez GA., Spasojevic M, Faas MM, de Vos P. Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. *Front Bioeng Biotechnol.* 2014;2:1–15.
2. Maia FR, Fonseca KB, Rodrigues G, Granja PL, Barrias CC. Matrix-driven formation of mesenchymal stem cell-extracellular matrix microtissues on soft alginate hydrogels. *Acta Biomater.* 2014;10(7):3197–208.
3. Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):149–65.
4. Poncelet D, de Vos P, Suter N, Jayasinghe SN. Bio-electrospraying and cell electrospinning: Progress and opportunities for basic biology and clinical sciences. *Adv Healthc Mater.* 2012;1(1):27–34.
5. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
6. Ko I, Kim B. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Myocardial Infarction. *Int J Stem Cells.* 2008;1(1):49–54.
7. Kassis I, Petrou P, Vaknin-Dembinsky A, Karussis D. Mesenchymal stem cells in neurological diseases. *Clin Investig.* 2013;3(2):173–89.
8. Ghieh F, Jurjus R, Ibrahim A, Geagea AG, Daouk H, Baba B El, Chams S, Matar M, Zein W, Jurjus A. The Use of Stem Cells in Burn Wound Healing: A Review. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–9.
9. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JAW. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology.* 2015;71(2):181–97.

10. Правдюк АИ, Петренко ЮА, Холодный ВС, Грищук ВП, Петренко АЮ. Изучение криочувствительности мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер. Проблемы криобиологии. 2010;20(3):62–70.
11. Pravdyuk AI, Petrenko YA, Fuller BJ, Petrenko AY. Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells. Cryobiology. 2013;66:215-222.
12. Gryshkov O, Hofmann N, Lauterboeck L, Pogozhykh D, Mueller T, Glasmacher B. Multipotent stromal cells derived from common marmoset *Callithrix jacchus* within alginate 3D environment: Effect of cryopreservation procedures. Cryobiology; 2015;71(1):103-11.
13. Fuller BJ, Petrenko AY, Rodriguez JV, Somov AY, Balaban CL GE. Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. Cryo Letters. 2013;34(4):432–52.
14. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. Annu Rev Med. 1995;46:235–47.
15. Кравченко ЛП, Шанина ИВ, Белоус АМ, Сампсон В. Эффективность сахарозосодержащего раствора при холодовом хранении целой печени крысы. Проблемы криобиологии. 1997;3:45–8.
16. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. Exp Hematol. 2003;31(8):723–32.
17. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci. 2000;97(7):3213–8.
18. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the

nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393–5.

19. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41–9.
20. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, De Villeroché VJ, Rossi GA, Brouty-Boyé D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*. 2005;85(8):962–71.
21. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*. 2004;295(2):395–406.
22. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211–28.
23. Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfus Med Hemotherapy*. 2008;35(3):228–38.
24. Mathieu PS, Lobo EG. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18(6):436–44.
25. Nava MM, Raimondi MT, Pietrabissa R. Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:1–12.

26. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393–403.
27. Oreffo ROC, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev.* 2005;1(2):169–78.
28. Santiago JA, Pogemiller R, Ogle BM. Heterogeneous differentiation of human mesenchymal stem cells in response to extended culture in extracellular matrices. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(12):3911–22.
29. Shoshani O, Ravid O, Massalha H, Aharonov A, Ovadya Y, Pevsner-Fischer M, Leshkowitz D, Zipori D. Cell isolation induces fate changes of bone marrow mesenchymal cells leading to loss or alternatively to acquisition of new differentiation potentials. *Stem Cells.* 2014;32(8):2008–20.
30. Somoza RA, Welter JF, Correa D, Caplan AI. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(6):596–608.
31. Chen S, Ryan DA, Dwyer MA, Cashman JR. Synergistic effect of Wnt modulatory small molecules and an osteoinductive ceramic on C2C12 cell osteogenic differentiation. *Bone.* 2014;67:109–21.
32. Zheng Y-H, Xiong W, Su K, Kuang S-J, Zhang Z-G. Multilineage differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Exp Ther Med.* 2013;5(6):1576–80.
33. Massirer KB, Carromeu C, Griesi-Oliveira K, Muotri AR. Maintenance and differentiation of neural stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011;3(1):107–14.
34. Takeda YS, Xu Q. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells. *PLoS One.* 2015;10(8):1–15.

35. Tropel P, Platet N, Platel JC, Noël D, Albrieux M, Benabid AL, Berger F. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(12):2868–76.
36. Hosoda T, Zheng H, Cabral-da-Silva M, Sanada F, Ide-Iwata N, Ogórek B, Ferreira-Martins J, Arranto C, D'Amario D, del Monte F, Urbanek K, D'Alessandro DA, Michler RE, Anversa P, Rota M, Kajstura J, Leri A. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. *Circulation*. 2011;123(12):1287-96.
37. Parmacek MS. Cardiac stem cells and progenitors: developmental biology and therapeutic challenges. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2006;117:239–256.
38. Gaspar JA, Doss MX, Hengstler JG, Cadenas C, Hescheler J, Sachinidis A. Unique metabolic features of stem cells, cardiomyocytes, and their progenitors. *Circ Res*. 2014;114(8):1346–60.
39. Palakkan AA, Nanda J, Ross J. Pluripotent stem cells to hepatocytes, the journey so far. *Biomed Rep*. 2017;6(4):367-373.
40. Stock P, Brückner S, Ebensing S, Hempel M, Dollinger MM, Christ B. The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver. *Nat Protoc*. 2010;5(4):617–27.
41. Lee K-D, Kuo TK-C, Whang-Peng J, Chung Y-F, Lin C-T, Chou S-H, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004;40(6):1275–84.
42. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Orellana MD, Freitas MCC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*. 2008;36(5):642–54.

43. Lin C-S, Xin Z-C, Deng C-H, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol.* 2010;25(6):807–15.
44. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006;20(13):1692–708.
45. Shih DT, Lee DC, Chen SC, Tsai RY, Huang CT, Tsai CC, Shen EY, Chiu WT. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells.* 2005;23(7):1012–20.
46. Kiseleva EV, Chermnykh ES, Vorotelyak EA, Volozhin AI, Vasiliev AV, Terskikh VV. Differentiation Capacity of Stromal Fibroblast-Like Cells from Human Bone Marrow, Adipose Tissue, Hair Follicle Dermal Papilla and Derma. *Cell and Tissue Biology.* 2009;3(1):42–9.
47. Chong P-P, Selvaratnam L, Abbas AA, Kamarul T. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2012;30(4):634–42.
48. Lee OK, Kuo TK, Chen W, Lee K, Hsieh S, Chen T. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004;103(5):1669–75.
49. Vellasamy S, Sandrasaigaran P, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *World J Stem Cells.* 2012;4(6):53–61.
50. Cananzi M, Atala A, De Coppi P. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *Reprod Biomed Online.* 2009;18(1):17–27.
51. Fei X, Jiang S, Zhang S, Li Y, Ge J, He B, Goldstein S, Ruiz G. Isolation, Culture, and Identification of Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67(2):689–94.

52. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, Jones EA, McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten FP. Mesenchymal Multipotency of Adult Human Periosteal Cells Demonstrated by Single-Cell Lineage Analysis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(4):1209-21.
53. Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H, Schäfer R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* 2013;11:1-20.
54. Götherström C. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Hematologica.* 2005;90:1017–26.
55. Sun T, Yu C, Gao Y, Zhao C, Hua J, Cai L, Guan W, Ma Y. Establishment and biological characterization of a dermal mesenchymal stem cells line from bovine. *Biosci Rep.* 2014;34(2):139–46.
56. Watt FM, Jordan PW, O'Neill CH. Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(15):5576–80.
57. Li L, Fukunaga-Kalabis M, Yu H, Xu X, Kong J, Lee JT, Herlyn M. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *J Cell Sci.* 2010;123(6):853–60.
58. Byun JH, Kang EJ, Park SC, Kang DH, Choi MJ, Rho GJ, Park BW. Isolation of human mesenchymal stem cells from the skin and their neurogenic differentiation in vitro. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2012;38(6):343–53.
59. Riekstina U, Muceniece R, Cakstina I, Muiznieks I, Ancans J. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology.* 2008;58(3):153-62.

60. Петренко ЮА, Петренко АЮ, Ревенко ЕБ, Скоробогатова НН, Волкова НА. Мезенхимальные стромальные клетки дермы человека. Журн. АМН України. 2010;16:144–5.
61. Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, Bader A. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2008;17(11):925-32.
62. Trivedi P, Tray N, Nguyen T, Nigam N, Gallicano GI. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Treatment of Cardiovascular Disease: Helping People Sooner or Later. *Stem Cells Dev*. 2010;19(7):1109-20.
63. Lechner A, Habener JF. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(2):E259-66.
64. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol*. 2011;10(7):649–56.
65. Dreifke MB, Ebraheim NA, Jayasuriya AC. Investigation of potential injectable polymeric biomaterials for bone regeneration. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2013;101A(8):2436–47.
66. Gómez-Aristizábal A, Keating A, Davies JE. Mesenchymal stromal cells as supportive cells for hepatocytes. *Mol Ther*. 2009;17(9):1504–8.
67. Mead B, Berry M, Logan A, Scott RAH, Leadbeater W, Scheven BA. Direct Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Res*. 2015;14(3):243-57.
68. Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(1):49–57.
69. Sakiyama-Elbert S. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. *StemBook*. 2008;(314):1–18.

70. Komeri R, Muthu J. In situ crosslinkable elastomeric hydrogel for long-term cell encapsulation for cardiac applications. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(12):2936-44.
71. Hoesli CA, Kiang RLJ, Raghuram K, Pedroza RG, Markwick KE, Colantuoni AMR, Piret JM. Mammalian Cell Encapsulation in Alginate Beads Using a Simple Stirred Vessel. *J Vis Exp*. 2017;124:1-12.
72. Qayyum AS, Jain E, Kolar G, Kim Y, Sell SA, Zustiak SP. Design of electrohydrodynamic sprayed polyethylene glycol hydrogel microspheres for cell encapsulation. *Biofabrication*. 2017;9(2):1-16.
73. Zamora DO, Natesan S, Christy RJ. Constructing a Collagen Hydrogel for the Delivery of Stem Cell-loaded Chitosan Microspheres. *J Vis Exp*. 2012;(64):1-7.
74. Qi C, Yan X, Huang C, Melerzanov A, Du Y. Biomaterials as carrier, barrier and reactor for cell-based regenerative medicine. *Protein Cell*. 2015;6(9):638-53.
75. De Vos P, Lazarjani HA, Poncelet D, Faas MM. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;67-68:15-34.
76. Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface*. 2014;11(100):20140817.
77. Bünger CM, Gerlach C, Freier T, Schmitz KP, Pilz M, Werner C, Jonas L, Schareck W, Hopt UT, de Vos P. Biocompatibility and surface structure of chemically modified immunisolating alginate-PLL capsules. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(4):1219-27.
78. Nguyen VB, Wang CX, Thomas CR, Zhang Z. Mechanical properties of single alginate microspheres determined by microcompression and finite element modelling. *Chem Eng Sci*. 2009;64(5):821-9.
79. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci*. 2006;6(8):623-33.

80. Kopecek J. Hydrogel biomaterials: a smart future? *Biomaterials*. 2007;28(34):5185-92.
81. Oyen ML. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *Int Mater Rev*. 2014;59(1):44–59.
82. Chang TM. Semipermeable Microcapsules. *Science*. 1964;146(3643):524–5.
83. Leong JY, Lam WH, Ho KW, Voo WP, Lee MFX, Lima HP, Lima SL, Teyab BT, Ponceletc D, Chan ES. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology*. 2016;24:44–60.
84. Chen B, Wright B, Sahoo R, Connon CJ. A novel alternative to cryopreservation for the short-term storage of stem cells for use in cell therapy using alginate encapsulation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(7):568-76.
85. Lee KY, David J, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):106–26.
86. Castro GR, Kamdar RR, Panilaitis B, Kaplan DL. Triggered release of proteins from emulsan-alginate beads. *J Control Release*. 2005;109(1–3):149–57.
87. Andersen T, Strand BL, Formo K, Alsberg E, Christensen BE. Alginates as biomaterials in tissue engineering. *Carbohydr. Chem*. 2012;37:227-58.
88. Setty CM, Sahoo SS, Sa B. Alginate-coated alginate-polyethyleneimine beads for prolonged release of furosemide in simulated intestinal fluid. *Drug Dev Ind Pharm*. 2005;31(4–5):435–46.
89. Capone SH, Dufresne M, Rechel M, Fleury MJ, Salsac AV, Paullier P, Daujat-Chavanieu M, Legallais C. Impact of Alginate Composition: From Bead Mechanical Properties to Encapsulated HepG2/C3A Cell Activities for In Vivo Implantation. *PLoS One*. 2013;8(4):e62032.

90. Haug A, Myklestad S, Larsen B, Smidsrød O. Correlation between Chemical Structure and Physical Properties of Alginates. *Acta Chem. Scand.* 1967;21(3):768–78.
91. Natesan S, Baer DG, Walters TJ, Babu M, Christy RJ. Adipose-derived stem cell delivery into collagen gels using chitosan microspheres. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(4):1369–84.
92. Keegan ME, Royce SM, Fahmy T, Saltzman WM. In vitro evaluation of biodegradable microspheres with surface-bound ligands. *J Control Release.* 2006;110(3):574–80.
93. Zhang H, Ju XJ, Xie R, Cheng CJ, Ren PW, Chu LY. A microfluidic approach to fabricate monodisperse hollow or porous poly(HEMA-MMA) microspheres using single emulsions as templates. *J Colloid Interface Sci.* 2009;336(1):235–43.
94. Olabisi RM. Cell microencapsulation with synthetic polymers. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2015;103(2):846–59.
95. Mahou R, Meier RRH, Bühler LH, Wandrey C. Alginate-poly(ethylene glycol) hybrid microspheres for primary cell microencapsulation. *Materials (Basel).* 2014;7(1):275–86.
96. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials.* 1999;20(1):45-53.
97. Urtuvia V, Maturana N, Acevedo F, Peña C, Díaz-Barrera A. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017;33(11):198.
98. Hay ID, Rehman ZU, Moradali MF, Wang Y, Rehm BHA. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb Biotechnol.* 2013;6(6):637–50.
99. Chee SY, Wong PK, Wong CL. Extraction and characterisation of alginate from brown seaweeds (Fucales, Phaeophyceae) collected from Port Dickson, Peninsular Malaysia. *J Appl Phycol.* 2011;23(2):191–6.

100. Mari A, Rokstad A, Lacík I, Vos P De, Strand BL. Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation ☆. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;67–68:111–30.
101. Mørch ÅA, Donati I, Strand BL, Skja G. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules.* 2006;7(5):1471-80.
102. Li L, Fang Y, Vreeker R, Appelqvist I, Mendes E. Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolecules.* 2007;8(2):464-8.
103. Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett.* 1973;32(1):195–8.
104. Seo S, Ph D, Choi Y, Akaike T. Alginate / Galactosylated Chitosan / Heparin Scaffold As a New Synthetic Extracellular Matrix for Hepatocytes. *Tissue Eng.* 2006;12(1):33–44.
105. Li RH, Altreuter DH, Gentile FT. Transport Characterization of Cell Encapsulation. *Biotechnol Bioeng.* 2003;50(4):365–73.
106. Kintzios S, Yiakoumetis I, Moschopoulou G, Mangana O, Nomikou K, Simonian A. Differential effect of the shape of calcium alginate matrices on the physiology of immobilized neuroblastoma N2a and Vero cells: A comparative study. *Biosens Bioelectron.* 2007;23(4):543–8.
107. Hwang CM, Sant S, Masaeli M, Kachouie NN, Zamanian B, Lee SH, Khademhosseini A. Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering. *Biofabrication.* 2010;2(3):035003.
108. Ko H-F, Sfeir C, Kumta PN. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 2010;368(1917):1981–97.
109. Slaughter B V, Fisher OZ. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater.* 2009;21(0):3307–29.

110. Davis IS, Shachar-Hill B, Curry MR, Kim KS, Pedley TJ, Hill AE. Osmosis in semi-permeable pores: an examination of the basic flow equations based on an experimental and molecular dynamics study. *Proc R Soc A Math Phys Eng Sci.* 2007;463(2079):881–96.
111. Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials.* 2001;22(6):511–21.
112. Vériter S, Mergen J, Goebbels RM, Aouassar N, Grégoire C, Jordan B, Levêque P, Gallez B, Gianello P, Dufrane D. In Vivo Selection of Biocompatible Alginates for Islet Encapsulation and Subcutaneous Transplantation. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(5):1503–13.
113. Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Hallé JP. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials.* 2006;27(20):3691–700.
114. Chan LW, Liu X, Heng PWS. Liquid phase coating to produce controlled-release alginate microspheres. *J Microencapsul.* 2005;22(8):891–900.
115. Tsai FH, Kitamura Y, Kokawa M. Liquid-core alginate hydrogel beads loaded with functional compounds of radish by-products by reverse spherification: Optimization by response surface methodology. *Int J Biol Macromol.* 2017;96:600–10.
116. Zhang H, Tumarkin E, Peerani R, Nie Z, Sullan RM, Walker GC, Kumacheva E. Microfluidic production of biopolymer microcapsules with controlled morphology. *J Am Chem Soc.* 2006;128(37):12205–10.
117. Skjåk-Bræk G, Grasdalen H, Smidsrød O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydr Polym.* 1989;10(1):31–54.
118. Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng.* 1984;26(1):53–8.
119. Radovich JM. Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells. *Enzyme Microb Technol.* 1985;7(1):1–10.

120. Holte O, Tønnesen HH, Karlsen J. Measurement of diffusion through calcium alginate gel matrices. *Pharmazie*. 2006;61:30–4.
121. Oyaas J, Storrø I, Svendsen H, Levine DW. The effective diffusion coefficient and the distribution constant for small molecules in calcium-alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng*. 1995;47(4):492–500.
122. Jayant RD, McShane MJ, Srivastava R. Polyelectrolyte-coated alginate microspheres as drug delivery carriers for dexamethasone release. *Drug Deliv*. 2009;16(6):331–40.
123. Bidoret A, Martins E, De Smet BP, Poncelet D. Cell Microencapsulation: Dripping Methods. *Methods Mol Biol*. 2017;1479:43-55.
124. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980;210(4472):908-10.
125. Safley SA, Cui H, Cauffiel S, Tucker-Burden C, Weber CJ. Biocompatibility and immune acceptance of adult porcine islets transplanted intraperitoneally in diabetic NOD mice in calcium alginate poly-L-lysine microcapsules versus barium alginate microcapsules without poly-L-lysine. *J Diabetes Sci Technol*. 2008;2(5):760–7.
126. Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T, Murphy M, Moloney MK, Schmehl M, Harris M, Mendez R, Mendez R, Sandford PA. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet*. 1994;343(8903):950–1.
127. Lewinska D, Bukowski J, Kozuchowski M, Kinasiewicz A, Werynski A. Electrostatic Microencapsulation of Living Cells. *Biocybern Biomed Eng*. 2008;28(2):69–84.
128. Poncelet D, Neufeld RJ, Goosen MFA, Burgarski B, Babak V. Formation of microgel beads by electric dispersion of polymer solutions. *AIChE J*. 1999;45(9):2018–23.

129. Bugarski B, Li Q, Goosen MFA, Poncelet D, Neufeld RJ, Vunjak G. Electrostatic Droplet Generation: Mechanism. *AIChE J.* 1994;40(6):1026–31.
130. Strand BL, Coron AE, Skjak-Braek G. Current and future perspectives on alginate encapsulated pancreatic islet. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(4):1053–8.
131. Martins S, Sarmiento B, Souto EB, Ferreira DC. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery - Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. *Carbohydr Polym.* 2007;69(4):725–31.
132. Khanna O, Larson JC, Moya ML, Opara EC, Brey EM. Generation of Alginate Microspheres for Biomedical Applications. *J Vis Exp.* 2012;(66):1–5.
133. de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials.* 2006;27(32):5603–17.
134. Heiligenstein S, Cucchiaroni M, Laschke MW, Bohle RM, Kohn D, Menger MD, Madry H. In Vitro and In Vivo Characterization of Nonbiomedical- and Biomedical-Grade Alginates for Articular Chondrocyte Transplantation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(8):829–42.
135. Jitraruch S, Dhawan A, Hughes RD, Filippi C, Soong D, Philippeos C, Lehec SC, Heaton ND, Longhi MS, Mitry RR. Alginate Microencapsulated Hepatocytes Optimised for Transplantation in Acute Liver Failure. *PLoS One.* 2014;9(12):e113609.
136. Berndt M, Li Y, Seyedhassantehrani N, Yao L. Fabrication and Characterization of Microspheres Encapsulating Astrocytes for Neural Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng.* 2017;3(7):1313-21.
137. Enomoto T, Oda T, Aoyagi Y, Sugiura S, Nakajima M, Satake M, Noguchi M, Ohkohchi N. Consistent liver metastases in a rat model by portal

- injection of microencapsulated cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(23):11131–9.
138. Goren A, Dahan N, Goren E, Baruch L, Machluf M. Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoimmunogenic platform for long-term cellular therapy. *FASEB J.* 2010;24(1):22–31.
139. Aoki T, Jin Z, Nishino N, Kato H, Shimizu Y, Niiya T, Murai N, Enami Y, Mitamura K, Koizumi T, Yasuda D, Izumida Y, Avital I, Umehara Y, Demetriou AA, Rozga J, Kusano M. Intrasplenic transplantation of encapsulated hepatocytes decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90 % partial hepatectomy in rats. *Transplantation.* 2005;79(7):783-90.
140. Hosseini SM, Sharafkhah A, Koohi-Hosseiniabadi O, Semsar-Kazerooni M. Transplantation of neural stem cells cultured in alginate scaffold for spinal cord injury in rats. *Asian Spine J.* 2016;10(4):611–8.
141. Forster RE, Thürmer F, Wallrapp C, Lloyd AW, Macfarlane W, Phillips GJ, Boutrand JP, Lewis AL. Characterisation of physico-mechanical properties and degradation potential of calcium alginate beads for use in embolisation. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(7):2243–51.
142. Hunt NC, Smith AM, Gbureck U, Shelton RM, Grover LM. Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta Biomater.* 2010;6(9):3649–56.
143. Desai RM, Koshy ST, Hilderbrand SA, Mooney DJ, Joshi NS. Versatile click alginate hydrogels crosslinked via tetrazine-norbornene chemistry. *Biomaterials.* 2015;50(1):30–7.
144. Duvivier-Kali VF, Omer A, Parent RJ, O’Neil JJ, Weir GC. Complete protection of islets against allojection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. *Diabetes.* 2001;50(8):1698–705.

145. Hariyadi DM, Hendradi E, Purwanti T, Fadil FDGP, Ramadani CN. Effect of cross linking agent and polymer on the characteristics of ovalbumin loaded alginate microspheres. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(4):469–74.
146. Matricardi P, Meo C Di, Coviello T, Alhaique F. Recent advances and perspectives on coated alginate microspheres for modified drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008;5(4):417-25.
147. Davarc?? F, Turan D, Ozcelik B, Poncelet D. The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocoll.* 2017;62:119–27.
148. De Vos P, De Haan BJ, Wolters GH, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia.* 1997;40(3):262–70.
149. Chandy T, Mooradian DL, Rao GHR. Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation. *Artif Organs.* 1999;23(10):894–903.
150. Zimmermann H, Shirley SG, Zimmermann U. Alginate-based encapsulation of cells: Past, present, and future. *Curr Diab Rep.* 2007;7(4):314–20.
151. Жмакин АИ. Физические основы криобиологии. *Uspekhi Fiz Nauk.* 2008;178(3):243-266.
152. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2015;1257:3–19.
153. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: Principles and practice. *Transfusion.* 2007;47(5):935–45.
154. Rubinsky B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev.* 2003;8(3):277–84.
155. Gómez-Lechón MJ, Lahoz A, Jiménez N, Vicente Castell J, Donato MT. Cryopreservation of rat, dog and human hepatocytes: influence of

- preculture and cryoprotectants on recovery, cytochrome P450 activities and induction upon thawing. *Xenobiotica*. 2006;36(6):457–72.
156. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*. 1986;23(1):1–13.
 157. Da Violante G1, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(12):1600–3.
 158. Carraher CE, Barot G, Shahi K, Roner MR. Influence of DMSO on the inhibition of various cancer cells by water-soluble organotin polyethers. *J Chinese Adv Mater Soc*. 2013;1(4):294–304.
 159. Chiralt A, Martínez-Navarrete N, Martínez-Monzó J, Talens P, Moraga G, Ayala A, Fito P. Changes in mechanical properties throughout osmotic processes. *J Food Eng*. 2001;49(2–3):129–35.
 160. Towey JJ, Soper AK, Dougan L. What happens to the structure of water in cryoprotectant solutions? *Faraday Discuss*. 2013;167(0):159–76.
 161. Devireddy R V. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Hum Reprod*. 2000;15(5):1125–35.
 162. Motta JPR, Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF, Porto LC. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology*. 2014;68(3):343–8.
 163. Asher EC, Dacey JWH, Jarníková T, Tortell PD. Measurement of DMS, DMSO, and DMSP in natural waters by automated sequential chemical analysis. *Limnol. Oceanogr.: Methods*. 2015;13:451–62.
 164. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J*. 2014;28(3):1317–30.

165. Lin J, Novak B, Moldovan D. Molecular dynamics simulation study of the effect of DMSO on structural and permeation properties of DMPC lipid bilayers. *J Phys Chem B*. 2012;116(4):1299–308.
166. Cheng C-Y, Song J, Pas J, Meijer LHH, Han S. DMSO Induces Dehydration near Lipid Membrane Surfaces. *Biophys J*. 2015;109(2):330–9.
167. Lee Y, Pincus PA, Hyeon C. Effects of dimethyl sulfoxide on surface water near phospholipid bilayers. *Biophys J*. 2016;111(11):2481-2491.
168. Ricci M, Oliva R, Del Vecchio P, Paolantoni M, Morresi A, Sassi P. DMSO-induced perturbation of thermotropic properties of cholesterol-containing DPPC liposomes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2016;1858(12):3024–31.
169. Roy S, Arora S, Kumari P, Ta M. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton’s jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*. 2014;68(3):467–72.
170. Minguell J. Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol*. 2001;1416(8):507–20.
171. Davies OG, Smith AJ, Cooper PR, Shelton RM, Scheven BA. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology*. 2014;69(2):342–7.
172. Mitchell A, Rivas KA, Smith R, Watts AE. Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95 % autologous serum and 5 % DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95 % and DMSO at 10 or 5 %. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2015;6(1):231.
173. Naaldijk Y, Staude M, Fedorova V, Stolzing A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnol*. 2012;12(1):49.

174. Yuan Z, Lourenco SDS, Sage EK, Kolluri KK, Lowdell MW, Janes SM. Cryopreservation of human mesenchymal stromal cells expressing TRAIL for human anti-cancer therapy. *Cytotherapy*. 2016;18(7):860–9.
175. Bhattacharya N, Stubblefield P. Regenerative Medicine Using Pregnancy-Specific Biological Substances. In: Minguell JJ. *Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells*. London. 2011. p. 249-255.
176. Wang Z, Richter SM, Gates BD, Grieme TA. Safety Concerns in a Pharmaceutical Manufacturing Process Using Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as a Solvent. *Org. Process Res. Dev.* 2012;16(12):1994–2000.
177. Weber M. Some Safety Aspects on the Design of Sparger Systems for the. *Process Saf Prog.* 2006;25(4):326–30.
178. Halberstadt M, Böhnke M, Athmann S, Hagenah M. Cryopreservation of Human Donor Corneas with Dextran. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(12):5110-5.
179. Fry LJ, Querol S, Gomez SG, Mcardle S, Rees R, Madrigal JA. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang.* 2015;109(2):181-90.
180. Asghar W, Assal R El, Shafiee H, Anchan RM, Demirci U. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnol J.* 2014;9(7):895-903.
181. Yuan Y, Yang Y, Yuchen T, Park J, Dai A, Roberts RM, Liu Y, Han X. Efficient long-term cryopreservation of pluripotent stem cells at -80 °C. *Scientific Reports.* 2016;6:1–13.
182. Costa PF, Dias AF, Reis RL, Gomes ME. Cryopreservation of cell/scaffold tissue-engineered constructs. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(11):852-8.
183. Bhakta G, Lee KH, Magalhães R, Wen F, Gouk SS, Hutmacher DW, Kuleshova LL. Cryoreservation of alginate-fibrin beads involving bone

- marrow derived mesenchymal stromal cells by vitrification. *Biomaterials*. 2009;30(3):336–43.
184. Canaple L, Nurdin N, Angelova N, Saugy D, Hunkeler D, Desvergne B. Maintenance of primary murine hepatocyte functions in multicomponent polymer capsules--in vitro cryopreservation studies. *J Hepatol*. 2001;34(1):11–8.
185. Gurruchaga H, Ciriza J, Saenz Del Burgo L, Rodriguez-Madoz JR, Santos E, Prosper F, Hernández RM, Orive G, Pedraz JL. Cryopreservation of microencapsulated murine mesenchymal stem cells genetically engineered to secrete erythropoietin. *Int J Pharm*. 2015;485(1–2):15–24.
186. Zhang W, Yang G, Zhang A, Xu LX, He X. Preferential vitrification of water in small alginate microcapsules significantly augments cell cryopreservation by vitrification. *Biomed Microdevices*. 2010;12(1):89–96.
187. Правдюк АИ, Петренко ЮА, Холодный ВС, Грищук ВП, Петренко АЮ. Изучение криочувствительности мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер. *Проблемы криобиологии*. 2010;20(3):235-45.
188. Gryshkov O, Pogozykh D, Hofmann N, Pogozykh O, Mueller T, Glasmacher B. Encapsulating non-human primate multipotent stromal cells in alginate via high voltage for cell-based therapies and cryopreservation. *PLoS One*. 2014 26;9(9):e107911.
189. Aoki T, Koizumi T, Kobayashi Y, Yasuda D, Izumida Y, Jin Z, Nishino N, Shimizu Y, Kato H, Murai N, Niiya T, Enami Y, Mitamura K, Yamamoto T, Kusano M. A novel method of cryopreservation of rat and human hepatocytes by using encapsulation technique and possible use for cell transplantation. *Cell Transplant*. 2005;14(9):609–20.
190. Pennington BO, Clegg DO, Melkounian ZK, Hikita ST. Defined culture of human embryonic stem cells and xeno-free derivation of retinal pigmented

- epithelial cells on a novel, synthetic substrate. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Feb;4(2):165-77.
191. Mayer FQ, Baldo G, De Carvalho TG, Lagranha VL, Giugliani R, Matte U. Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-l-iduronidase. *Artif Organs.* 2010;34(5):434–9.
 192. Mahler S, Desille M, Frémond B, Chesné C, Guillouzo A, Campion JP, Clément B. Hypothermic storage and cryopreservation of hepatocytes: The protective effect of alginate gel against cell damages. *Cell Transplant.* 2003;12(6):579–92.
 193. Wright B, Cave R a, Cook JP, Khutoryanskiy V V, Mi S, Chen B, Leyland M, Connon CJ. Enhanced viability of corneal epithelial cells for efficient transport/storage using a structurally modified calcium alginate hydrogel. *Regen Med.* 2012;7(3):295–307.
 194. Yuan-Gang L, Bai Y, Shi-Bin W, Ai-Zheng C, Wen-Guo W. Effect of the Storage Temperatures on BRL-encapsulated-alginate-PLO-alginate (APornA) Microcapsules. *J Biomim Biomater Tissue Eng.* 110;18(2):1-4
 195. Dontchos BN, Coyle CH, Izzo NJ, Didiano DM, Karpie JC, Logar A, Chu CR. Optimizing CO₂ normalizes ph and enhances chondrocyte viability during cold storage. *J Orthop Res.* 2008;26(5):643–50.
 196. Puguán JMC, Yu X, Kim H. Diffusion characteristics of different molecular weight solutes in Ca-alginate gel beads. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2015;469:158–65.
 197. Aslani P, Kennedy RA. Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. *J Control Release.* 1996;42(1):75–82.
 198. Favre E, Leonard M, Laurent A, Dellacherie E. Diffusion of polyethyleneglycols in calcium alginate hydrogels. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2001;194(1–3):197–206.

199. Golmohamadi M, Wilkinson KJ. Diffusion of ions in a calcium alginate hydrogel-structure is the primary factor controlling diffusion. *Carbohydr Polym.* 2013;94(1):82–7.
200. Hunt NC, Shelton RM, Grover LM. Reversible mitotic and metabolic inhibition following the encapsulation of fibroblasts in alginate hydrogels. *Biomaterials.* 2009;30(32):6435–43.
201. Feisst V, Brooks AES, Chen CJ, Dunbar PR. Characterization of Mesenchymal Progenitor Cell Populations Directly Derived from Human Dermis. *Stem Cells Dev.* 2014;23(6):631-42.
202. Salerno S, Messina A, Giordano F, Drioli E, De Bartolo L. Dermal-epidermal membrane systems by using human keratinocytes and mesenchymal stem cells isolated from dermis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;71:943-53.
203. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *BioMed Research International.* 2014;2014(1):1-11.
204. Phelan K, May KM. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Cell Biol.* 2015;66:1-22.
205. Bara JJ, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells.* 2014;32(7):1713-23.
206. Gryshkov O, Pogozhykh D, Zernetsch H, Hofmann N, Mueller T, Glasmacher B. Process engineering of high voltage alginate encapsulation of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;36:77-83.
207. Brunner E, Ehrlich H, Schupp P, Hedrich R, Hunoldt S, Kammer M, Machill S, Paasch S, Bazhenov VV, Kurek DV, Arnold T, Brockmann S, Ruhnaw M, Born R. Chitin-based scaffolds are an integral part of the

- skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*. *J Struct Biol*. 2009;168(3):539–47.
208. Ehrlich H, Steck E, Ilan M, Maldonado M, Muricy G, Bavestrello G, Kljajic Z, Carballo JL, Schiaparelli S, Ereskovsky A, Schupp P, Born R, Worch H, Bazhenov VV, Kurek D, Varlamov V, Vyalikh D, Kummer K, Sivkov VV, Molodtsov SL, Meissner H, Richter G, Hunoldt S, Kammer M, Paasch S, Krasokhin V, Patzke G, Brunner E, Richter W. Three-dimensional chitin-based scaffolds from *Verongida* sponges (Demospongiae: Porifera). Part II: Biomimetic potential and applications. *Int J Biol Macromol*. 2010;47(2):141–5.
209. King MA. Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2000;243(1–2):155–66.
210. Katsen-Globa A, Peter L, Zöllner S, Dörge T, Daffertshofer M, Preckel H, Schmitt D, Zimmermann H. A Novel Approach for Automated Analysis of Cell Attachment and Spreading Based on Backscattered Electron Imaging by Scanning Electron Microscopy. *Materials (Basel)*. 2009;2(3):1402–16.
211. Berridge M V, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11(5):127–52.
212. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*. 2012;114(8):785–96.
213. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sängler M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiat Oncol*. 2012;7(1):1–6.
214. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 2004. p. 1-31.

215. Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. *J Immunol Methods*. 2001;252(1–2):131–8.
216. Gorokhova NA, Petrenko YA, Tkachova EN. Alamar Blue-test as a method of assessing metabolic activity of human embryonic cells. *Матеріали II Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь та поступ в біології”*, 21-24 березня 2006 р, м Львів. 2006; С. 353.
217. O’Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421–6.
218. Rampersad SN. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. 2012;12347–60.
219. Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Nature Publishing Group*; 2012;3(11):e430-7.
220. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
221. Farag MMS, Sobh MA, Shalaby AAA, Ewais EEA. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of osteogenic human amniotic fluid- derived stem cells. *Int J Adv Res*. 2015;3(12):1475-1482.
222. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279–95.
223. Kilnran JA. Histological and histochemical methods. Theory and practice. *Eur J Histochem*. 2016; 60(1): 2639.

224. Коваленко ИФ, Коваленко СЕ, Высеканцев ИП, Петренко ТФ, Розанов ЛФ, Чернобай НА. Влияние режимов криоконсервирования на поведение клеток СПЭВ в культуре. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016;26(2):116-23.
225. Orive G, Santos E, Poncelet D, Hernández RM, Pedraz JL, Wahlberg LU, De Vos P, Emerich D. Cell encapsulation: technical and clinical advances. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(8):537–46.
226. Wright B, Cave R a, Cook JP, Khutoryanskiy V V, Mi S, Chen B, Leyland M, Connon CJ. Enhanced viability of corneal epithelial cells for efficient transport/storage using a structurally modified calcium alginate hydrogel. *Regen Med.* 2012;7(3):295–307.
227. Bienaimé C, Barbotin J-N, Nava-Saucedo J-E. How to build an adapted and bioactive cell microenvironment? A chemical interaction study of the structure of Ca-alginate matrices and their repercussion on confined cells. *J Biomed Mater Res A.* 2003;67(2):376–88.
228. Sugiura S, Oda T, Aoyagi Y, Matsuo R, Enomoto T, Matsumoto K, Nakamura T, Satake M, Ochiai A, Ohkohchi N, Nakajima M. Microfabricated airflow nozzle for microencapsulation of living cells into 150 micrometer microcapsules. *Biomed Microdevices.* 2007;9(1):91–9.
229. Fizman GL, Karara AL, Finocchiaro LME, Glikin GC. A laboratory scale device for microencapsulation of genetically engineered cells into alginate beads. *Electron J Biotechnol.* 2002;5(3):279–83.
230. Schwinger C, Koch S, Jahnz U, Wittlich P, Rainov NG, Kressler J. High throughput encapsulation of murine fibroblasts in alginate using the JetCutter technology. *J Microencapsul.* 2002;19(3):273–80.
231. Lewińska D, Rosiński S, Weryński A. Influence of Process Conditions during Impulsed Electrostatic Droplet Formation on Size Distribution of Hydrogel Beads. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2004;32(1):41–53.

232. Manojlovic V, Djonlagic J, Obradovic B, Nedovic V, Bugarski B. Investigations of cell immobilization in alginate: Rheological and electrostatic extrusion studies. *J Chem Technol Biotechnol.* 2006;81(4):505–10.
233. Zhang Y, Rochefort D. Comparison of emulsion and vibration nozzle methods for microencapsulation of laccase and glucose oxidase by interfacial reticulation of poly(ethyleneimine). *J Microencapsul.* 2010;27(8):703–13.
234. Prüsse U, Bilancetti L, Bučko M, Bugarski B, Bukowski J, Gemeiner P, Lewińska D, Manojlovic V, Massart B, Nastruzzi C, Nedovic V, Poncelet D, Siebenhaar S, Tobler L, Tosi A, Vikartovská A, Vorlop KD. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chem Pap.* 2008;62(4):364–74.
235. Brandl F, Sommer F, Goepferich A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials.* 2007;28(2):134–46.
236. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science.* 2005;310(5751):1139-43.
237. Doyle JW, Roth TP, Smith RM, Li YQ, Dunn RM. Effect of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1996;32(4):561–8.
238. Lansdown ABG. Calcium: A potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair Regen.* 2002;10(5):271–85.
239. Liu WF, Nelson CM, Pirone DM, Chen CS. The Rockefeller University Press. *J Cell Biol.* 2014;173(3):431–41.
240. Hunt NC, Shelton RM, Grover LM. Reversible mitotic and metabolic inhibition following the encapsulation of fibroblasts in alginate hydrogels. *Biomaterials.* 2009;30(32):6435–43.

241. Uludag H, De Vos P, Tresco PA. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;42(1–2):29–64.
242. Jen AC, Wake MC, Mikos AG. Review: Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnol Bioeng.* 1996;50(4):357–64.
243. Зайков ВС, Тарусин ДН, Петренко АЮ. Влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы на жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток после экспозиции с проникающими криопротекторами. *Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2016;26(3):213–20.
244. Mutsenko VV, Gryshkov O, Lauterboeck L, Rogulska O, Tarusin DN, Bazhenov VV, Schütz K, Brüggemeier S, Gossia E, Akkineni AR, Meißner H, Lode A, Meschke S, Fromont J, Stelling AL, Tabachnik KR, Gelinsky M, Nikulin S, Rodin S, Tonevitsky AG, Petrenko AY, Glasmacher B, Schupp PJ, Ehrlich H. Novel chitin scaffolds derived from marine sponge *Ianthella basta* for tissue engineering approaches based on human mesenchymal stromal cells: Biocompatibility and cryopreservation. *Int J Biol Macromol.* 2017 Nov;104(Pt B):1955-65.
245. Тарусин ДМ, Зайков ВС, Петренко ОЮ. Пристрій для інкапсуляції біоматеріалів. Пат. 106836 Україна, МПК А61М 1/00. власник ІПКіК НАН України. - № u201510854; заявл. 06.11.2015; опублік. 10.05.2016, Бюл. № 9.
246. Tarusin DN, Zajkov VS, Petrenko YA, Petrenko AY. Encapsulation in alginate microspheres reduces mesenchymal stromal cell death during storage. *Cryobiology.* 2015;71(3):561
247. Petrenko A, Muzenko V, Rogulska E, Zaikov V, Mazur S, Tarusin D, Erlich H, Petrenko Y. Proliferation and differentiation potential of human adult mesenchymal stromal cells in three-dimensional culture. The effect of storage at cryogenic and ambient temperatures. *International Conference on*

Advances in Cell Biology and Biotechnology in Lviv, Ukraine. October 2015. P.15.

248. Tarusin DN, Mutsenko VV, Zaikov VS. Cause of Encapsulated Mesenchymal Stromal Cells Tolerance to Short-Term Storage. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2016;26(2):164.
249. Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW. Temperature Dependence of Mature Mouse Oocyte Membrane Permeabilities in the Presence of Cryoprotectant. *Cryobiology*. 1997;34(2):122–30.
250. Гордиенко Е.А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. *К Наукова думка*. 1994;142 с.
251. Тарасов А.И., Петренко А.Ю. Осмотические характеристики кроветворных клеток-предшественников эмбриональной печени человека. *Біофіз Вісник Харк ун-ту*. 2002;2(11):57–61.
252. Kusano T, Aoki T, Yasuda D, Matsumoto S, Jin Z, Nishino N, Hayashi K, Odaira M, Yamada K, Koizumi T, Izumida Y, Mitamura K, Enami Y, Niiya T, Murai N, Kato H, Shimizu Y, Kou K, Furukawa Y, Matsusita M, Todo S, Shioda S, Kusano M. Microcapsule technique protects hepatocytes from cryoinjury. *Hepatol Res*. 2008;38(6):593–600.
253. Renzi S, Lombardo T, Dotti S, Dessì SS, De Blasio P, Ferrari M. Mesenchymal Stromal Cell Cryopreservation. *Biopreserv Biobank*. 2012;10(3):276–81.
254. Serra M, Correia C, Malpique R, Brito C, Jensen J, Bjorquist P, Carrondo MJ, Alves PM. Microencapsulation technology: A powerful tool for integrating expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2011;6(8):1–13.
255. Sambu S, Xu X, Schiffer H a, Cui ZF, Ye H. RGDS-fuctionalized alginates improve the survival rate of encapsulated embryonic stem cells during cryopreservation. *Cryo Letters*. 2011;32(5):389–401.

256. Sambu S, Xu X, Ye H, Cui ZF. Predicting the survival rate of mouse embryonic stem cells cryopreserved in alginate beads. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med*. 2011;225(11):1092–107.
257. Cui ZF, Dykhuizen RC, Nerem RM, Sembanis A. Modeling of cryopreservation of engineered tissues with one-dimensional geometry. *Biotechnol Prog*. 2002;18(2):354–61.
258. John Morris G, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation - A review. *Cryobiology*. 2013;66(2):85–92.
259. Corwin WL, Baust JM, Baust JG, Van Buskirk RG. A08 Session 2: Biopreservation of biologics: Translation from stem cells to cancer: Differential activation of stress pathways in human mesenchymal stem cells following biopreservation. *Cryobiology*. 2014;69(1):186.
260. Sturtevant JM. Biochemical applications kinetics. *Annu Rev Phys Chem*. 1987;38(2):463–88.
261. Kittur FS, Harish Prashanth KV, Udaya Sankar K, Tharanathan RN. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydr Polym*. 2002;49(2):185–93.
262. Gryshkov O, Hofmann N, Lauterboeck L, Pogozhykh D, Mueller T, Glasmacher B. Multipotent stromal cells derived from common marmoset *Callithrix jacchus* within alginate 3D environment: Effect of cryopreservation procedures. *Cryobiology*. 2015;71(1):103-11.
263. Chinnadurai R, Garcia MA, Sakurai Y, Lam WA, Kirk AD, Galipeau J, Ian B. Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of human mesenchymal stromal cells in vivo. *Stem Cell Reports*. The Authors; 2014;3(1):60–72.
264. Carvalho KA, Cury CC, Oliveira L, Cattaned RI, Malvezzi M, Francisco JC, Pachalok A, Olandoski M, Faria-Neto JR, Guarita-Souza LC. Evaluation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Standard

- Cryopreservation Procedure Efficiency. *Transplant Proc.* 2008;40(3):839–41.
265. Тарусин ДН, Киреев ВА, Коваленко СЕ, Коваленко ИФ, Розанов ЛФ, Петренко АЮ. Выбор условий криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток в суспензии и альгинатных микросферах на основе изучения их осмотических реакций в растворе 1 М ДМСО. *Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2016;26(2):133–144.
266. Petrenko AYU, Zaikov VS, Pravduk AI, Trufanova NA, Tarusin DN, Petrenko YuA. Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells in Suspension and in Alginate Microspheres. *Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM in London, UK. October 2014.* P. 26.
267. Sanders RC Jr, Slayton WB, Cogle CR, Fisher RC, Scott EW. Stem cell research. *Paediatr Respir Rev.* 2006;7(2):135-40.
268. Trusal LR, Guzman AW, Baker CJ, Characterization of freeze-thaw induced ultrastructural damage to endothelial cells in vitro. *In Vitro.* 1984;20(4):353–64.
269. Holt W V, Head MF, North RD. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod.* 1992;46(6):1086–94.
270. Gorodetsky R, Levdansky L, Gaberman E, Gurevitch O, Lubzens E, McBride WH. Fibrin Microbeads Loaded with Mesenchymal Cells Support Their Long-Term Survival While Sealed at Room Temperature. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(7):745–55.
271. Walker NG, Mistry AR, Smith LE, Eves PC, Tsaknakis G, Forster S, Watt SM, Macneil S. A Chemically Defined Carrier for the Delivery of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells to Skin Wounds. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(2):143–55.

272. Place ES, Rojo L, Gentleman E, Sardinha JP, Stevens MM. Strontium- and Zinc-Alginate Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(21–22):2713–22.
273. Yang X, Gan Y, Gao X, Zhao L, Gao C, Zhang X, Feng Y, Ting K, Gou Z. Preparation and characterization of trace elements-multidoped injectable biomimetic materials for minimally invasive treatment of osteoporotic bone trauma. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2010;95(4):1170–81.
274. Ghahramanpoor MK, Najafabadi SAH, Abdouss M, Bagheri F, Eslaminejad MB. A hydrophobically-modified alginate gel system: Utility in the repair of articular cartilage defects. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(10):2365–75.
275. Shi CY, Ruan LQ, Feng YH, Fang JL, Song CJ, Yuan ZG DY. Marrow mesenchymal stem cell transplantation with sodium alginate gel for repair of spinal cord injury in mice. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2011;40(4):354–9.
276. Siti-Ismail N, Bishop AE, Polak JM, Mantalaris A. The benefit of human embryonic stem cell encapsulation for prolonged feeder-free maintenance. *Biomaterials*. 2008;29(29):3946–52.
277. Kurth T, Hedbom E, Shintani N, Sugimoto M, Chen FH, Haspl M, Martinovic S, Hunziker EB. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthr Cartil*. 2007;15(10):1178–89.
278. Herlofsen SR, K uchler AM, Melvik JE, Brinchmann JE. Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Self-Gelling Alginate Discs Reveals Novel Chondrogenic Signature Gene Clusters. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(7–8):1003–13.
279. Qi J, Chen A, You H, Li K, Zhang D, Guo F. Proliferation and chondrogenic differentiation of CD105-positive enriched rat synovium-

- derived mesenchymal stem cells in three-dimensional porous scaffolds. *Biomed Mater.* 2011;6(1):015006.
280. Re'em T, Kaminer-Israeli Y, Ruvinov E, Cohen S. Chondrogenesis of hMSC in affinity-bound TGF-beta scaffolds. *Biomaterials.* 2012;33(3):751–61.
281. Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *J Pharm Sci.* 1996;85(12):1325–30.
282. Pikal-Cleland KA, Carpenter JF. Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric β -galactosidase. *J Pharm Sci.* 2001;90(9):1255–68.
283. Cui L, Johkura K, Yue F, Ogiwara N, Okouchi Y, Asanuma K, Sasaki K. Spatial distribution and initial changes of SSEA-1 and other cell adhesion-related molecules on mouse embryonic stem cells before and during differentiation. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(11):1447–57.
284. Тарусин ДН, Петренко ЮА, Семенченко ОА, Муценко ВВ, Зайков ВС, Петренко АЮ. Эффективность сахарозо-содержащего раствора и раствора UW для гипотермического хранения мезенхимальных стромальных клеток человека в суспензии или в составе альгинатных микросфер. *Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2015;25(4):329–339.
285. Tarusin D, Mazur S, Volkova N, Petrenko Yu, Zaikov V, Petrenko A. Encapsulation of mesenchymal stromal cells in alginate microspheres. *Biotech Acta.* 2016;9(4):58–66.
286. Тарусин ДМ, Муценко ВВ, Зайков ВС, Петренко ОЮ, Петренко ЮО. Спосіб зберігання та транспортування клітин. Пат. 95902 Україна, МПК А01N 1/02.; власник ІПКіК НАН України. - № u201408225; заявл. 21.07.2014; опублік. 12.01.2015, Бюл. № 1.

287. Тарусин ДН, Зайков ВС, Муценко ВВ, Петренко ЮА. Устойчивость мезенхимальных стромальных клеток, инкапсулированных в альгинатные микросферы, к краткосрочному хранению при положительных температурах. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014;24(2):183.
288. Тарусин ДН, Зайков ВС, Муценко ВВ, Петренко ЮА, Петренко АЮ. Инкапсуляция в альгинатные микросферы – перспективный подход для транспортировки и краткосрочного хранения клеток. Ukr. Biochem. J. 2014;86(5):221.
289. Тарусин ДН, Зайков ВС, Муценко ВВ, Петренко ЮА. Влияние гипотермического хранения в различных средах на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015;25(2):183.
290. Tarusin DN, Mutsenko VV, Zaikov VS. Cause of encapsulated mesenchymal stromal cells tolerance to short-term storage. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2016;26(2):164.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. Тарусин Д. Н. Эффективность сахарозо-содержащего раствора и раствора UW для гипотермического хранения мезенхимальных стромальных клеток человека в суспензии или в составе альгинатных микросфер / Д. Н. Тарусин, Ю. А. Петренко, О. А. Семенченко, В. В. Муценко, В. С. Зайков, А. Ю. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 329–339. (Scopus). – Стаття.

2. Тарусин Д. Н. Выбор условий криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток в суспензии и альгинатных микросферах на основе изучения их осмотических реакций в растворе 1 М ДМСО / Д. Н. Тарусин, В. А. Киреев, С. Е. Коваленко, И. Ф. Коваленко, Л. Ф. Розанов, А. Ю. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №2. – С. 133–144. (Scopus) . – Стаття.

3. Зайков В. С. Влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы на жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток после экспозиции с проникающими криопротекторами // В. С. Зайков, Д. Н. Тарусин, А. Ю. Петренко / Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 213–220. (Scopus). – Стаття.

4. Tarusin D. Encapsulation of mesenchymal stromal cells in alginate microspheres / D. Tarusin, S. Mazur, N. Volkova, Yu. Petrenko, V. Zaikov, A. Petrenko // Biotech Acta. – 2016. – V. 9, №4. – С. 58–66. – Стаття.

5. Mutsenko V. Novel chitin scaffolds derived from marine sponge *Ianthella basta* for tissue engineering approaches based on human mesenchymal stromal cells: Biocompatibility and cryopreservation / Gryshkov O., Lauterboeck L., Rogulska O., Tarusin D., Bazhenov V., Schütz K., Brüggemeier S., Gossia E., Akkineni A., Meißner H., Lode A., Meshke S., Fromont J., Stelling A., Tabachnik K., Gelinsky M., Nikulin

S., Rodin S., Tonevitsky A., Petrenko A., Glasmacher B., Schupp P., Ehrlich H. // *Int J Biol Macromol.* – 2017. – 104(Pt B). – P. 1955–1965. (Scopus). – Стаття.

Патенти України

6. Пат. 95902 Україна, МПК А01N 1/02. Спосіб зберігання та транспортування клітин / Д. М. Тарусін, В. В. Муценко, В. С. Зайков, О. Ю. Петренко, Ю. О. Петренко ; власник ІПКіК НАН України. - № u201408225 ; заявл. 21.07.2014 ; опублік. 12.01.2015, Бюл. № 1. – Патент на корисну модель.

7. Пат. 106836 Україна, МПК А61М 1/00. Пристрій для інкапсуляції біоматеріалів / Д. М. Тарусін, В. С. Зайков, О. Ю. Петренко ; власник ІПКіК НАН України. - № u201510854 ; заявл. 06.11.2015 ; опублік. 10.05.2016, Бюл. № 9. – Патент на корисну модель.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

8. Тарусин Д. Н. Устойчивость мезенхимальных стромальных клеток, инкапсулированных в альгинатные микросферы, к краткосрочному хранению при положительных температурах / Д. Н. Тарусин, В. С. Зайков, В. В. Муценко, Ю. А. Петренко // *Проблемы криобиологии и криомедицины.* — 2014. — Т. 24, № 2. — С. 183. — рос., англ. – Тези: усна доповідь.

9. Тарусин Д. Н. Инкапсуляция в альгинатные микросферы – перспективный подход для транспортировки и краткосрочного хранения клеток / Д. Н. Тарусин, В. С. Зайков, В. В. Муценко, Ю. А. Петренко, А. Ю. Петренко // *Ukr. Biochem. J.* — 2014. — V. 86, № 5. — С. 221. — (Suppl. 2). – Тези: постерна участь.

10. Petrenko A. Yu. Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells in Suspension and in Alginate Microspheres / A. Yu. Petrenko, V. S. Zaikov, A. I. Pravduk, N. A. Trufanova, D. N. Tarusin, Yu. A Petrenko // *Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM in London, UK.* October 2014. P. 26. – Тези: заочна участь.

11. Petrenko A. Low temperature preservation of mesenchymal stromal cells seeded in various scaffolds for tissue equivalent development / A. Petrenko, V. S. Zaikov, V. V. Muzenko, D. N. Tarusin, H. Erlich // *J Cell Sci Ther.* — 2015. — V.6, № 2. — P. 118. – Тези: заочна участь.

12. Тарусин Д. Н. Влияние гипотермического хранения в различных средах на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер / Д. Н. Тарусин, В. С. Зайков, В. В. Муценко, Ю. А. Петренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. — 2015. — Т.25, №2. — С. 183. – Тези: устна доповідь.

13. Tarusin D. N. Encapsulation in alginate microspheres reduces mesenchymal stromal cell death during storage / D. N. Tarusin, V. S. Zajkov, Y. A. Petrenko, A. Y. Petrenko // Cryobiology. — 2015. — V.71, № 3. — P. 561. – Тези: постерна участь.

14. Tarusin D. Encapsulation in alginate microspheres enhances viability of mesenchymal stromal cells for efficient transport/short-term storage // Conference for Young Scientists (CYS-2015) in Kiev, Ukraine. September 2015. P. 43. – Тези: устна доповідь.

15. Petrenko A. Proliferation and differentiation potential of human adult mesenchymal stromal cells in three-dimensional culture. The effect of storage at cryogenic and ambient temperatures / A. Petrenko, V. Muzenko, E. Rogulska, V. Zaikov, S. Mazur, D. Tarusin, H. Erlich, Y. Petrenko // International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology in Lviv, Ukraine. October 2015. P.15. – Тези: постерна участь.

16. Tarusin D. N. Cause of Encapsulated Mesenchymal Stromal Cells Tolerance to Short-Term Storage / D. N. Tarusin, V. V. Mutsenko, V. S. Zaikov // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. — 2016. — V.26, № 2. — P. 164. – Тези: устна доповідь.