

УДК 57.086.13:544.77:678.554:611.013.395

Н.А. Труфанова^{1*}, И.Ф. Коваленко², А.Ю. Петренко¹

Выбор условий витрификации макропористых матриц, заселенных мезенхимальными стромальными клетками

UDC 57.086.13:544.77:678.554:611.013.395

N.A. Trufanova^{1*}, I.F. Kovalenko², O.Yu Petrenko¹

Choice of Vitrification Mode for Macroporous Matrices Seeded with Mesenchymal Stromal Cells

Реферат: В работе были определены состав раствора криопротекторов и условия витрификации (способы насыщения, удаления криопротекторов, режимы охлаждения-отогрева) тканеинженерных конструкций на основе макропористых матриц (МПМ) и мезенхимальных стромальных клеток (МСК), предупреждающих развитие кристаллизации и растрескивание стеклообразной фазы, а также исследовано влияние разработанных условий на жизнеспособность клеток и структуру МПМ. Процессы кристаллизации и растрескивания изучали при охлаждении и нагреве МПМ в растворах криопротекторов в криопробирках. Жизнеспособность МСК в суспензии определяли по окрашиванию трипановым синим, в составе МПМ – по окрашиванию этидиум бромидом и флуоресцеин диацетатом. Метаболическую активность МСК оценивали по МТТ-тесту. Показано, что выбранные условия обеспечивают высокую жизнеспособность МСК после витрификации в виде суспензии, но требуют усовершенствования для сохранения клеток, заселенных в макропористые матрицы.

Ключевые слова: тканеинженерные конструкции, макропористая матрица, витрификация, девитрификация, растрескивание, мезенхимальные стромальные клетки, жизнеспособность.

Реферат: У роботі були визначені склад розчину криопротекторів і умови вітрифікації (способи насичення, видалення криопротекторів, режими охолодження-відігріву) тканинної інженерних конструкцій на основі макропористих матриць (МПМ) і мезенхімальних стромальних клітин (МСК), що попереджали розвиток кристалізації та розтріскування склообразної фази, а також досліджено вплив розроблених умов на життєздатність клітин і структуру МПМ. Процеси кристалізації та розтріскування вивчали за умов охолодження і відігріву МПМ у розчинах криопротекторів у криопробірках. Життєздатність МСК у суспензії визначали за забарвленням трипановим синім, у складі МПМ – за фарбуванням етидіум бромідом і флуоресцеїн діацетатом. Метаболічну активність МСК оцінювали за МТТ-тестом. Показано, що обрані умови забезпечують високу життєздатність МСК після вітрифікації у вигляді суспензії, але вимагають удосконалення для збереження клітин, заселених у макропористі матриці.

Ключові слова: тканинної інженерні конструкції, макропористі матриці, вітрифікація, девітрифікація, розтріскування, мезенхімальні стромальні клітини, життєздатність.

Abstract: The composition of the solution of cryoprotectants and vitrification conditions (saturation methods, removal of cryoprotectants, cooling-warming modes) of tissue engineered constructs based on macroporous matrices (MPM) and mesenchymal stromal cells (MSCs), preventing the development of crystallization and cracking of a glassy phase, were determined and the influence of the developed conditions on cell viability and MPM structure was studied. Crystallization and cracking were investigated during MPM cooling and warming in cryoprotectant solutions in cryovials. The viability of MSCs in suspension was determined by trypan blue staining, and that as a part of MPM was examined by ethidium bromide and fluorescein diacetate staining. The MSCs metabolic activity was evaluated with the MTT test. The selected conditions were shown to provide a high viability of MSCs after vitrification in the form of a suspension, but required an improvement to preserve the cells seeded in macroporous matrices.

Key words: tissue engineered constructs, macroporous matrices, vitrification, devitrification, cracking, mesenchymal stromal cells, viability.

Использование тканеинженерных конструкций (ТИК) на базе макропористых матриц (МПМ) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) – перспективное направление реабилитации поврежденных тканей [4, 9], которое приобретает все большее значение в регенеративной медицине.

Для успешной реализации потенциала ТИК необходимо наличие эффективных методов их

The use of tissue-engineering constructs (TECs) based on macroporous matrices (MPM) and multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) is a promising area for the rehabilitation of damaged tissues [4, 9], which is getting increasingly important in regenerative medicine.

Successful implementation of the TEC potential requires the available effective methods for their long-term storage and establishing the banks of

¹Відділ кріобіохімії

²Відділ низькотемпературного консервування, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

¹ Department of Cryobiochemistry

² Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: n.a.trufan@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: n.a.trufan@gmail.com

Надійшла 28.08.2018

Прийнята до друку 11.02.2020

Received 28, August, 2018

Accepted 11, February, 2020

© 2020 N.A. Trufanova, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

длительного хранения и создание банков готовых к использованию конструкций. Гипотермические условия хранения обеспечивают высокие функциональные показатели ТИК только в течение непродолжительного времени [7]. Хранение в условиях культивирования также кратковременное, при этом оно требует значительных финансовых затрат, может вызвать изменения (или полную потерю) биологических функций и потенциала клеток. Методы криоконсервирования, основанные на витрификации – затвердевании системы в аморфном состоянии (состоянии стекла), являются перспективными для длительного хранения сложных трехмерных биологических систем. При витрификации не происходят процессы формирования кристаллов льда и связанного с этим концентрирования внеклеточного раствора электролитов, что позволяет сохранить как структуру МПМ, так и высокую жизнеспособность клеток в составе ТИК.

Однако на практике применение витрификации для криоконсервирования ТИК сталкивается с определенными трудностями. Переход системы в витрифицированное состояние происходит при ультравысоких скоростях охлаждения и/или высоких концентрациях криопротекторных веществ. Ультравысокие скорости охлаждения крайне сложно получить при использовании контейнеров закрытого типа, разрешенных в клинической практике. В случае умеренно высоких скоростей охлаждения для перевода системы в стеклообразное состояние используют высокие концентрации криопротекторов, токсичные для клеток. Это, в свою очередь, затрудняет насыщение ТИК витрифицирующимся раствором и требует более длительной экспозиции. Так, только после увеличения времени экспозиции при витрификации МСК в составе альгинатных микросфер показатели жизнеспособности были сопоставимы с полученными после витрификации МСК в виде суспензии в таком же растворе [22]. Однако при продолжительном контакте клеток с высокими концентрациями криопротекторов повышается вероятность их токсического повреждения.

При разработке протоколов витрификации необходимо учитывать риск девитрификации – формирования кристаллов льда на этапе отогрева предварительно витрифицированной системы [14, 15]. Показано, что кристаллизация на этапе отогрева приводит к гибели клеток [25]. Для успешной витрификации ТИК важно предупредить появление термомеханических напряжений, приводящих к растрескиванию массива стекла, что влечет разрушение трехмерной мат-

ready-to-use constructs. Hypothermic storage provides high functional characteristics of TECs only for a short time [7]. Storage under culture conditions is also a short-term, while it requires sound financial costs, can cause changes (or complete loss) of biological functions and cell potential. Cryopreservation methods based on vitrification or solidification of the system in an amorphous state (glass state) are promising for a long-term storage of the complex three-dimensional biological systems. During vitrification, no ice crystal formation and the associated concentration of an extracellular electrolyte solution occur, that enables saving both the structure of the MPM and high cell viability in the TEC.

However, in practice, the use of vitrification for the TECs cryopreservation faces certain difficulties. The system transition to a vitrified state occurs at ultra-high cooling rates and / or high concentrations of cryoprotective substances. Ultra-high cooling rates are extremely difficult to obtain when using the closed containers, permitted for clinical practice. In the case of moderately high cooling rates, high concentrations of cryoprotectants toxic to the cells are used to transfer the system to a glassy state. This, in turn, makes it difficult to saturate the TEC with a vitrification solution and requires a longer exposure. So, only after an increase in the exposure time during vitrification of MSCs as a part of alginate microspheres, the viability indices were comparable with those obtained after vitrification of MSCs in the form of a suspension in the same solution [22]. However, with a prolonged contact of cells with high concentrations of cryoprotectants, the probability of toxic damage increases.

When developing vitrification protocols, it is necessary to take into account the risk of devitrification, *i. e.* the formation of ice crystals at the stage of warming the pre-vitrified system [14, 15]. Crystallization at the warming stage was shown to lead to a cell death [25]. For successful vitrification of TECs, it is important to prevent the appearance of thermomechanical stresses resulting in the glass bulk cracking which entails the destruction of the three-dimensional matrix [21], the induction of crystallization and cell damage.

Thus, despite the prospect of vitrification for a long-term storage of TECs, the questions of choosing the composition of a cryoprotectant solution, saturation and cooling-warming conditions of the system remain open.

The purpose of this research was to determine the composition of a cryoprotectant solution and



рицы [21], индукцию кристаллизации и повреждение клеток.

Таким образом, несмотря на перспективность витрификации для длительного хранения ТИК, открытыми остаются вопросы выбора состава раствора криопротекторов, режимов насыщения и охлаждения-отогрева системы.

Цель работы – определение состава раствора криопротекторов и условий витрификации тканеинженерных конструкций на основе макропористых матриц и мезенхимальных стромальных клеток, позволяющих избежать развития кристаллизации и растрескивания застеклованного образца, а также изучение влияния разработанных условий на жизнеспособность клеток.

Материалы и методы

Для разработки состава витрифицирующихся растворов использовали композиции из диметилсульфоксида (ДМСО), этиленгликоля (ЭГ), 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и сахарозы (обозначенные ДЭПС) [22] в различных концентрациях. В качестве базового раствора был выбран фосфатный буфер или сахарозо-солевой раствор (ССР) [11]. В некоторых экспериментах в состав растворов включали полиэтиленгликоль (ПЭГ-400, ПЭГ-8000), поливиниловый спирт (ПВС-9000), все реактивы производства «Sigma» (США). В работе использовали диски альгинат-желатиновых МПМ, полученных методом криотропного гелирования, диаметром 5 мм и толщиной 1 мм. Матрицы были предоставлены проф. В.И. Лозинским (Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова, Российской академии наук, Россия), их свойства и биосовместимость с МСК описаны нами ранее [17]. Скрининг эффективных композиций проводили визуально, оценивая развитие кристаллизации [3] при быстром охлаждении МПМ путем погружения в жидкий азот в растворе объемом 0,5 мл в криопробирках 1,8 мл («Nunc», США) и при отогреве на водяной бане 37°C. Стеклообразующую способность растворов оценивали в баллах по развитию кристаллизации в альгинатных носителях на этапе отогрева после насыщения и быстрого охлаждения: 1 – носитель белого цвета, формирование кристаллов льда во всем объеме матрицы; 2 – белая окраска в центре носителя, кристаллизация не во всем объеме матрицы; 3 – носитель прозрачный, отсутствие кристаллизации. Число экспериментов (*n*) для каждого исследуемого раствора составляло 8–10. Использовали следующие режимы охлаждения образцов: одноэтапный – погружение в жидкий азот; двухэтапный – погружение в жидкий азот на 25 с и

vitrication modes for of tissue-engineering constructs, based on macroporous matrices and mesenchymal stromal cells, which avoid the development of crystallization and cracking of a vitrified sample, as well as studying an influence of the developed conditions on cell viability.

Materials and methods

To develop the composition vitrification solutions, we used dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), 1,2-propanediol (1,2-PD), and sucrose (abbreviated as DEPS) [22] at various concentrations. A phosphate buffer or sucrose-salt solution (SSS) was used as the baseline [11]. In some experiments, the composition of the solutions comprised polyethylene glycol (PEG-400, PEG-8000), polyvinyl alcohol (PVA-9000), all reagents used were of Sigma production (USA). We used alginate-gelatin MPM disks obtained by cryotropic gelation with a 5 mm diameter and of 1 mm thickness. The matrices were provided by Prof. Lozinsky V.I. (A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Russia), their properties and biocompatibility with MSCs were described by us earlier [17]. Effective compositions were visually screened, assessing the development of crystallization [3] upon rapid cooling of MPM by immersion into liquid nitrogen in a 0.5 ml solution in 1.8 ml cryovials (Nunc, USA) and by warming in a water bath 37°C. The glass-forming ability of solutions was evaluated in points based on the development of crystallization in alginate carriers at the stage of warming after saturation and rapid cooling: 1 – white carrier, the formation of ice crystals in the entire matrix; 2 – white color in the center of the carrier, crystallization is not in the entire volume of matrix; 3 – transparent carrier, lack of crystallization. The number *n* of experiments for each test solution was 8–10. We used the following modes of sample cooling: one-stage – an immersion into liquid nitrogen; two-stage – an immersion into liquid nitrogen for 25 s and subsequent placement over the nitrogen mirror (–130...–150°C), as well as warming modes: one-stage – transfer from liquid nitrogen vapor to a water bath (37–40°C); two-stage – transfer from liquid nitrogen vapors to room temperature conditions (20°C) for 30 s, then warming in a water bath (37–40°C).

The experiments were performed in human adult derma-derived MSCs, obtained in accordance with the recommendations of the Helsinki Declaration of the World Association for Biomedical Research and in conformity with the requirements of



последующее размещение над зеркалом азота ($-130 \dots -150^{\circ}\text{C}$), а также режимы отогрева: одноступенчатый – перенос из паров жидкого азота в водяную баню ($37-40^{\circ}\text{C}$); двухэтапный – перенос из паров жидкого азота в условия комнатной температуры (20°C) на 30 с, затем отогрев на водяной бане ($37-40^{\circ}\text{C}$).

Эксперименты выполняли на МСК дермы взрослого человека, которые были получены в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации Всемирной ассоциации по проведению биомедицинских исследований и согласно требованиям биоэтического комитета Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков).

Клетки выделяли методом эксплантации фрагментов кожи [8]. Монослойное и трехмерное в составе МПМ культивирование МСК (4–10-го пассажей) проводили в среде α -MEM («РАА», Австрия) с 10% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота («РАА»), 50 мкг/мл стрептомицина и 50 ед/мл пенициллина при 37°C , 95% влажности и 5% CO_2 . Для заселения МСК в МПМ применяли перфузионный метод [16]. Перед витрификацией МСК в составе МПМ их культивировали в течение недели.

Конструкции на базе МСК и МПМ насыщали раствором криопротекторов перфузионным методом [16] или путем переноса в возрастающем градиенте концентраций криопротекторов. Насыщение суспензии МСК раствором криопротекторов моделировали следующим образом: перфузионный метод – 25 мкл суспензии клеток смешивали с 25 мкл 20%-го раствора ДМСО, выдерживали при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин, после чего вносили 950 мкл ДЭПС, перемешивали и выдерживали 3 мин; перенос в градиенте концентраций – суспензию клеток выдерживали по 4 мин в смесях раствора ДЭПС и среды DMEM в соотношениях 1:4, 3:2 и 1:0. После насыщения матрицу с МСК или суспензию в объеме 0,5 мл переносили в криопробирки и витрифицировали либо удаляли криопротекторы без этапа охлаждения-отогрева.

Криопротекторы удаляли путем внесения к деконсервированному образцу 0,5 М раствора сахарозы в соотношении 1:10, затем постепенно добавляли равный объем среды DMEM. После чего носитель с МСК переносили в среду культивирования, а суспензию клеток центрифугировали 10 мин при 200g, осадок суспендировали в среде α -MEM с 10% ЭС. Жизнеспособность МСК в суспензии определяли с помощью окрашивания трипановым синим [19] метаболическую активность – по МТТ-тесту [18]. Жиз-

the Bioethical Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv).

Cells were isolated by skin fragment explantation [8]. Monolayer and three-dimensional, as part of MPM, cultures of MSCs (4–10 passages) were performed in α -MEM medium (PAA, Austria) with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA), 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ streptomycin, and 50 units / ml penicillin at 37°C , 95% humidity and 5% CO_2 . To seed MSCs into MPM, the perfusion method was used [16]. Prior to vitrification of MSCs as a part of MPM, they were cultured for a week.

MSCs- and MPMs-based constructs were saturated with a solution of cryoprotectants by perfusion [16] or by transfer in series of cryoprotectant solutions with increasing concentration gradient. The saturation of the MSC suspension with a cryoprotectant solution was performed as follows: to model perfusion method 25 μl of the cell suspension was mixed with 25 μl of a 20% DMSO solution, kept at a temperature of $2-8^{\circ}\text{C}$ for 10 min, afterwards 950 μl of DPS was added, mixed and kept 3 min; to model transfer in a concentration gradient the cell suspension was kept for 4 min in mixtures of DEPS solution and DMEM medium in ratios of 1: 4, 3: 2, and 1: 0. After saturation, the matrix with MSCs or 0.5 ml suspension was transferred to cryovials and vitrified or cryoprotectants were removed without a cooling-warming step.

Cryoprotectants were removed by adding a 0.5 M sucrose solution to the warmed sample in a ratio of 1:10, then an equal volume of DMEM was gradually added. Afterwards the carrier with MSCs was transferred to the culture medium, and the cell suspension was centrifuged for 10 min at 200g, the pellet was suspended in α -MEM medium with 10% FBS. MSC viability in suspension was determined using trypan blue staining [19], and metabolic activity using the MTT test [18]. The viability of MSCs in MPM was evaluated by double staining with ethidium bromide (EB) / fluorescein diacetate (FDA) [6]. The incorporation of fluorescent dyes into cells was evaluated using a LSM 510 META confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany).

The results were statistically processed using the non-parametric Mann-Whitney test. Data were presented as $M \pm m$; differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

We previously showed that a solution containing 10% DMSO; 20% EG; 20% 1,2-PD; 0.5 M sucrose



неспособность МСК в составе МПМ оценивали по двойному окрашиванию этидиум бромидом (ЭБ)/ флуоресцеин диацетатом (ФДА) [6]. Включение флуоресцентных красителей в клетки оценивали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа «LSM 510 МЕТА» («Carl Zeiss», Германия).

Полученные результаты статистически обрабатывали, используя непараметрический критерий Манна-Уитни. Данные приводили в виде $M \pm m$, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Ранее нами показано, что раствор, содержащий 10% ДМСО; 20% ЭГ; 20% 1,2-ПД; 0,5 М сахарозы на базе фосфатного буфера (обозначенный ДЭПС 10/20/20), эффективен для витрификации МСК как в виде суспензии, так и в составе альгинатных микросфер [22]. Кроме того установлено, что для сохранения жизнеспособности МСК в составе микросфер необходимо увеличение времени насыщения раствором криопротекторов. Исходя из данных фактов в настоящем исследовании раствор ДЭПС 10/20/20 был выбран в качестве исходного. На первом этапе работы оценивали влияние продолжительности насыщения МПМ раствором криопротекторов методом перфузии на формирование в них кристаллов льда во время быстрого охлаждения и отогрева. При визуальном анализе установлено, что в растворе, окружающем МПМ, видимые кристаллы льда не образуются на этапах охлаждения и отогрева. Во всех образцах МПМ, которые предварительно насыщали витрифицирующимся раствором от 1 до 15 мин, визуальные признаки кристаллизации на этапе охлаждения не были выявлены, но на этапе отогрева наблюдалось формирование кристаллов льда (табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что матрицы являются индукторами кристаллизации. Действительно, неоднородная пористая структура МПМ может усиливать гетерогенную нуклеацию. В еще большей степени это относится к использованным в данной работе МПМ, представляющим собой криогели, поры которых сформированы поликристаллами растворителя в замороженном состоянии [17], что, вероятно, повышает их нуклеационную способность.

В последующих экспериментах исследовали влияние модификаций исходного раствора на его стеклообразующую способность, которую оценивали по наличию либо отсутствию визуальных признаков кристаллизации в МПМ на этапе отогрева.

based on phosphate buffer (abbreviated as DEPS 10/20/20) is effective for vitrification of MSCs both in the form of a suspension and as part of alginate microspheres [22]. In addition, it was found that in order to maintain the viability of MSCs as a part of microspheres, it is necessary to increase the time of saturation with a solution of cryoprotectants. Based on these facts, in the present study, solution DEPS 10/20/20 was chosen as the initial one. At the first stage of the research, we evaluated the effect of the duration of MPM saturation with the cryoprotectant solution by perfusion on the formation of ice crystals in matrices during rapid cooling and warming. A visual analysis showed that in the solution surrounding the MPM, no visible ice crystals were formed at the cooling and warming stages. In all samples of MPM, preliminarily saturated with a vitrification solution from 1 to 15 min, no visual signs of crystallization were detected at the cooling stage, but the ice crystals were formed at the warming stage (Table 1). The results obtained indicate that the matrices induce crystallization. Indeed, the inhomogeneous porous structure of the MPM can enhance heterogeneous nucleation. To an even greater extent, this applies to the MPM used in this work, which are the cryogels with the pores formed by polycrystals of the solvent in a frozen state [17], likely increasing their nucleation ability.

In subsequent experiments, the effect of modifications of the initial solution on its glass-forming ability was studied, that was evaluated by the presence or absence of visual signs of crystallization in the MPM at the warming stage.

Fig. 1 demonstrates that an increased DMSO concentration improved the glass-forming ability of the solutions to a greater extent than a rise in EG concentration, that agrees with the data of Baudot A. *et al.* [2, 3], indicating a higher glass-forming ability of DMSO if compared with EG. However, the modified solutions did not completely prevent the development of crystallization in MPM. The absence of visual signs of crystallization was observed only in the case of using a solution containing 20% DMSO, 30% EG, 20% 1,2-PD. At the same time, it should be borne in mind that these concentrations of cryoprotectants are potentially highly toxic.

To suppress the formation of ice, sugars [12], high molecular weight compounds [20] and synthetic ice blockers (SIBs) [24, 25] are introduced into the composition of vitrification solutions. We modified the initial solution by increasing the concentration of DMSO to 15% and using SSS as the base solution (abbreviated as DEPS 15/20/20). The composition of the initial and modified solu-

Из рис. 1 видно, что повышение концентрации ДМСО улучшало стеклообразующую способность растворов в большей степени, чем повышение концентрации ЭГ, что соответствует данным А. Vaudot и соавт. [2, 3], свидетельствующим о более высокой стеклообразующей способности ДМСО по сравнению с ЭГ. Однако модифицированные растворы полностью не предотвращали развитие кристаллизации в МПМ. Отсутствие визуальных признаков кристаллизации наблюдали только в случае применения раствора, содержащего 20% ДМСО, 30% ЭГ, 20% 1,2-ПД. В то же время следует учитывать, что указанные концентрации криопротекторов потенциально являются высокотоксичными.

Для подавления образования льда в состав витрифицирующихся растворов вводят сахара [12], высокомолекулярные соединения [20] и синтетические блокаторы льдообразования (СБЛ) [24, 25]. Мы модифицировали исходный раствор путем повышения концентрации ДМСО до 15% и использования ССР в качестве базового раствора (обозначен ДЭПС 15/20/20). Состав исходного и модифицированного растворов дополняли различными СБЛ (ПЭГ-400 / ПЭГ-8000 или ПВС).

Установлено, что добавление указанных СБЛ в состав исходного раствора ДЭПС 10/20/20 улучшало его стеклообразующую способность и уменьшало количество образующихся кристаллов льда, но только присутствие 1% ПВС полностью ингибировало развитие кристаллизации (рис. 2). Кристаллизация отсутствовала в растворе ДЭПС 15/20/20, дополненном 5% ПЭГ-400 либо 1–5% ПЭГ-8000, либо 1% ПВС. Развитие кристаллизации ПВС подавлял в большей степени, чем ПЭГ, что, вероятно, связано с различными механизмами их действия. Так, ПВС обладает способностью блокировать нуклеацию и подавлять рост кристаллов льда и рекристаллизацию, прикрепляясь к поверхности зародышей льда и граням кристаллов [24, 25]. В то же время ПЭГ имеет более узконаправленное действие – связывает молекулы воды путем формирования с ними водородных связей [5] и уменьшает количество молекул воды, которые могут перемещаться к растущему кристаллу льда. Таким образом, модификация исходного раствора путем повышения концентрации ДМСО до 15% и

Развитие кристаллизации в МПМ в зависимости от времени насыщения раствором ДЭПС 10/20/20
Crystallization development in MPM depending on time of saturation with DEPS 10/20/20 solution

Время насыщения раствором, мин Time of saturation with solution, min	Развитие кристаллизации на этапах Development of crystallization	
	быстрого охлаждения at rapid cooling stage	отогрева at warming stage
1	–	+
2	–	+
3	–	+
5	–	+
10	–	+
15	–	+

Примечания: «+» – матрица имеет белую окраску вследствие кристаллизации; «–» – матрица прозрачная, отсутствие визуально выявляемой кристаллизации.

Notes: ‘+’ – whitening of matrix due to crystallization development; ‘–’ – transparent matrix, absence of visually detected crystallization.

tions was supplemented with various SIBs (PEG-400/ PEG-8000 or PVA).

It was found that the addition of the indicated SIBs to the composition of the initial DEPS 10/20/20 solution improved its glass forming ability and reduced the number of ice crystals formed, but only the presence of 1% PVA completely inhibited the development of crystallization (Fig. 2). Crystallization was absent in the DEPS 15/20/20 solu-

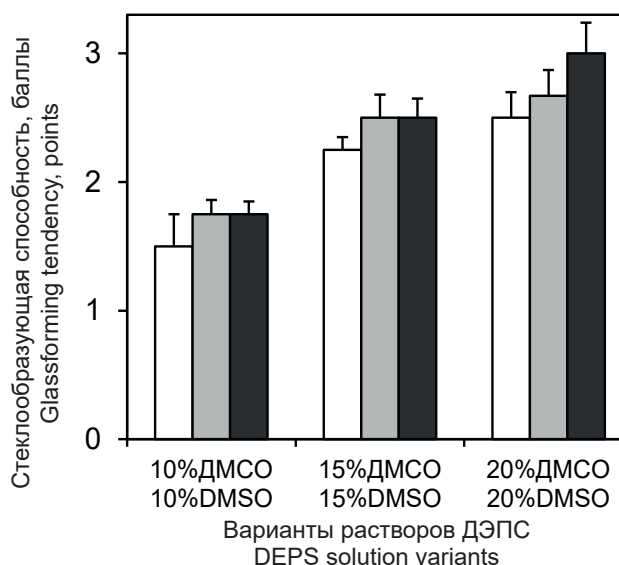


Рис. 1. Стеклообразующая способность растворов ДЭПС, содержащих различные концентрации ДМСО и ЭГ (□ – 20%; ■ – 25%; ■ – 30%).

Fig. 1. Glass-forming tendency of DEPS solutions with different concentrations of DMSO and EG (□ – 20%; ■ – 25%; ■ – 30%).



добавления 1% ПВС позволяет предупредить развитие кристаллизации в МПМ на этапе отогрева (рис. 3).

Одной из критических проблем при витрификации ТИК является растрескивание массива сформированного стекла, нарушающее целостность трехмерной матрицы. Растрескивание является следствием термомеханического стресса, развивающегося при высоких скоростях охлаждения. При криоконсервировании путем витрификации ТИК охлаждают, как правило, погружением в жидкий азот [26], что повышает вероятность растрескивания стекла. Предупредить этот эффект позволяет медленное изменение температур в диапазоне, близком к температуре стеклоперехода (glass transition temperature, T_g) [21].

С целью минимизации растрескивания мы оценивали влияние различных режимов охлаждения и отогрева на целостность структуры застеклованного образца (МПМ в растворе ДЭПС 15/20/20 с 1% ПВС). На рис. 4, А видно, что при одноэтапном охлаждении (погружение в жидкий азот) происходило растрескивание формирующейся стеклообразной фазы. Последующий одноэтапный отогрев усиливал начавшийся процесс растрескивания (рис. 4, В). Двухэтапный режим охлаждения, разработанный с использо-

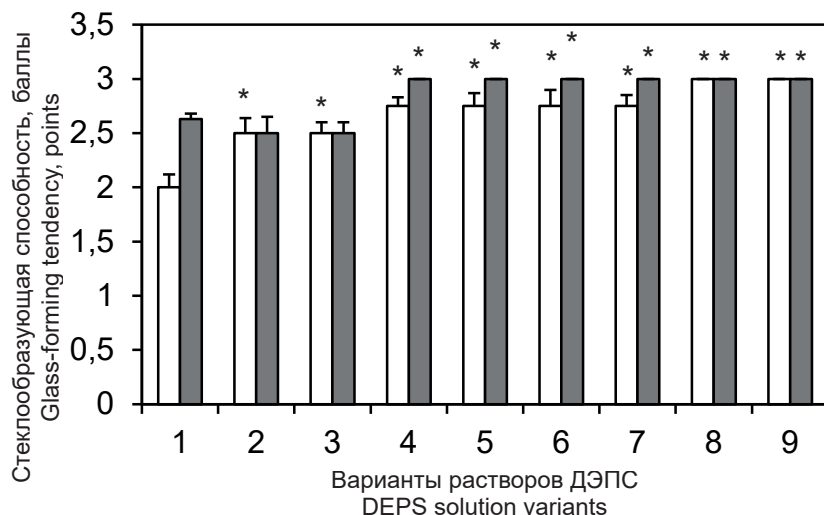


Рис. 2. Стеклообразующая способность растворов ДЭПС, содержащих различные концентрации ДМСО (□ – 10%; ■ – 15%) и синтетические блокаторы льдообразования: 1 – без СБЛ; 2 – 1% ПЕГ-400; 3 – 2% ПЕГ-400; 4 – 5% ПЕГ-400; 5 – 1% ПЕГ-8000; 6 – 2% ПЕГ-8000; 7 – 5% ПЕГ-8000; 8 – 1% ПВС; 9 – 1% ПЕГ-8000 + 1% ПВС. * – различия статистически значимы по сравнению с соответствующим раствором без добавок, $p < 0,05$.

Fig. 2. Glass-forming tendency of DEPS solutions with different concentrations of DMSO (□ – 10%; ■ – 15%) and synthetic ice blockers: 1 – without SIBs; 2 – 1% PEG-400; 3 – 2% PEG-400; 4 – 5% PEG-400; 5 – 1% PEG-8000; 6 – 2% PEG-8000; 7 – 5% PEG-8000; 8 – 1% PVA; 9 – 1% PEG-8000 + 1% PVA. * – differences are significant if compared with corresponding solution without additives, $p < 0.05$.

tion supplemented with 5% PEG-400 or 1–5% PEG-8000, or 1% PVA. The development of by PVA crystallization was suppressed to a greater extent than by PEG, which is probably associated with various mechanisms of their action. Thus, PVA has the ability to block nucleation and suppress the growth of ice crystals and recrystallization by attaching to the ice nuclei and crystal surfaces [24, 25]. At the same time, PEG has a more

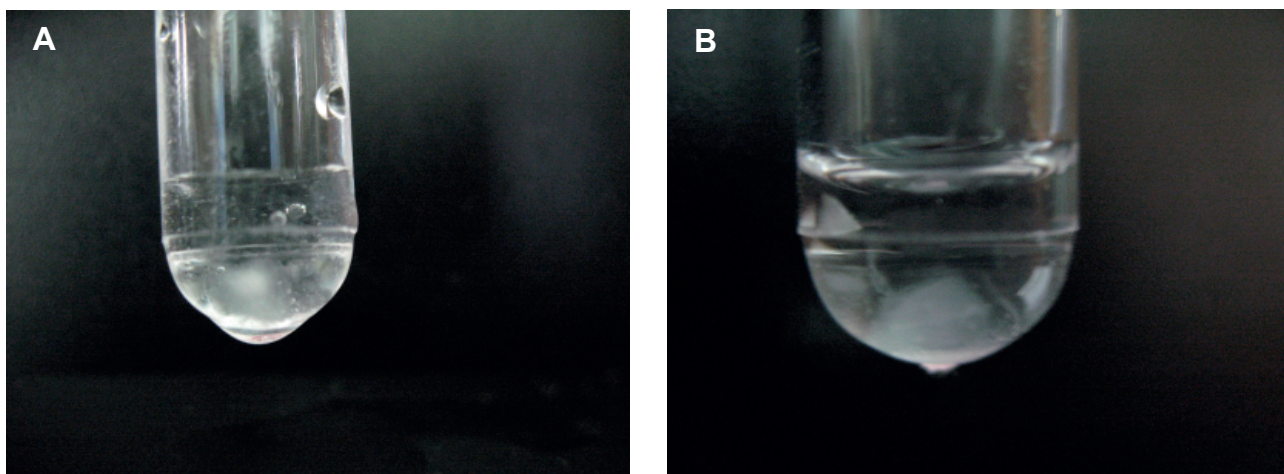


Рис. 3. Макропористые матрицы на этапе отогрева после предварительного быстрого охлаждения в соответствующем криозащитном растворе: А – ДЭПС 15/20/20, развитие кристаллизации (белая окраска в центре матрицы); В – ДЭПС 15/20/20 + 1% ПВС, отсутствие визуально выявляемой кристаллизации (матрица прозрачная).

Fig. 3. Macroporous matrices at warming stage after previous rapid cooling in corresponding cryoprotective solution: А – DEPS 15/20/20, development of crystallization (whitening in the matrix center); В – DEPS 15/20/20 + 1% PVA, absence of visually detected crystallization (transparent matrix).

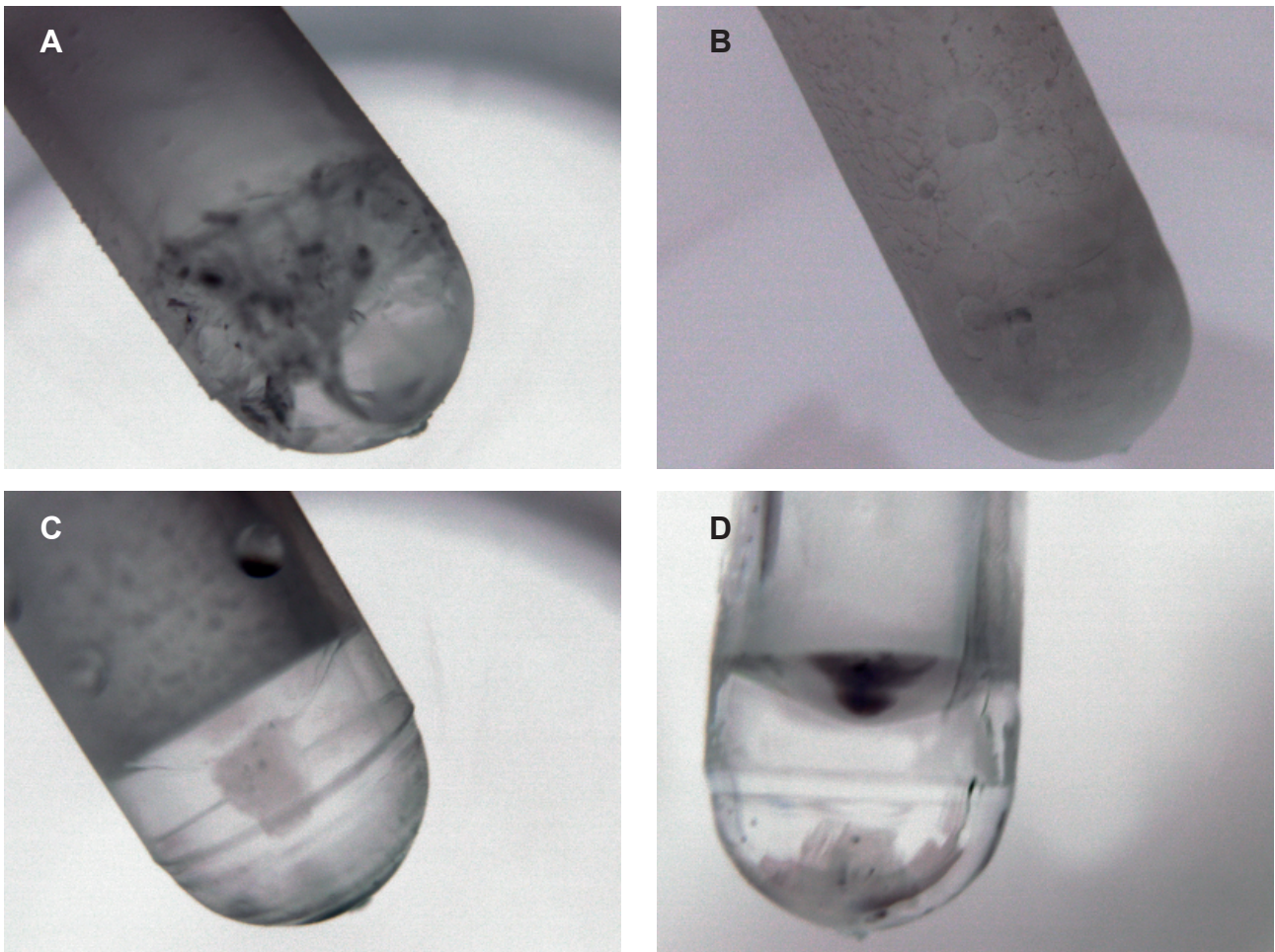


Рис. 4. Состояние образцов в криозащитном растворе на этапах охлаждения и отогрева: **А** – растрескивание после одноэтапного охлаждения (погружением в жидкий азот); **В** – растрескивание, одноэтапный отогрев после одноэтапного охлаждения; **С** – стабильная стеклообразная фаза после двухэтапного охлаждения; **Д** – стабильная стеклообразная фаза, двухэтапный отогрев после двухэтапного охлаждения. Негатив фотоснимка.

Fig. 4. State of specimens in cryoprotective solution at cooling and warming stages: **A** – cracking after one stage cooling (plunging into liquid nitrogen); **B** – cracking, one stage warming after one stage cooling; **C** – stable glassy phase after two stage cooling; **D** – stable glassy phase, two stage warming after two stage cooling. Negative.

ванием ранее полученных температурных характеристик исходного раствора ДЭПС [22], предупреждал растрескивание (рис. 4, С). При этом стабильность стеклообразной фазы, очевидно, обеспечивалась быстрым снижением температуры на первом этапе с преодолением критического диапазона температур, в котором возможно образование кристаллов льда, и медленным переходом в твердое аморфное состояние через T_g на втором этапе, достаточным по времени для релаксации термомеханических напряжений. При последующем двухэтапном отогреве растрескивание не наблюдали (рис. 4, D).

При выборе условий, обеспечивающих сохранение структуры МПМ в процессе витрификации, необходимо учитывать их влияние на состояние клеток в составе ТИК. В связи с этим изучали жизнеспособность суспензии МСК на разных этапах витрификации с применением

narrow action, *i. e.* it binds water molecules by forming hydrogen bonds with them [5] and reduces the number of water molecules that can move to a growing ice crystal. Thus, the modification of the initial solution by increasing the DMSO concentration up to 15% and adding 1% PVA allows to prevent the development of crystallization in MPM at the warming stage (Fig. 3).

One of the critical problems in the vitrification of TECs is the cracking of the formed bulk of glass, which impairs an integrity of the three-dimensional matrix. Cracking is a consequence of thermo-mechanical stress that develops at high cooling rates. During cryopreservation by vitrification, TECs are cooled, as a rule, by immersion into liquid nitrogen [26], which increases the likelihood of glass cracking. This effect can be prevented by a slow temperature change in the range close to the glass transition temperature (T_g) [21].



модифицированных растворов и двухэтапных режимов охлаждения-отогрева. После экспозиции МСК в растворах ДЭПС 15/20/20 без и с добавлением 1% ПЭГ-8000 отмечали снижение жизнеспособности по окрашиванию трипановым синим на 20% по сравнению с контролем (рис. 5). После экспозиции в растворе, дополненном 1% ПВС, жизнеспособность снижалась в меньшей степени (на 10%) и была значимо выше ($p < 0,05$), чем в растворе без добавок. После витрификации под защитой ДЭПС 15/20/20 без СБЛ и с 1% ПЭГ-8000 жизнеспособность МСК была ниже на 40%, а с 1% ПВС – на 20% по отношению к контролю (рис. 5). Таким образом, добавление 1% ПВС в раствор криопротекторов позволяет в большей степени сохранить жизнеспособность МСК как после экспозиции, так и после витрификации. Защитный эффект ПВС при контакте клеток с высокими концентрациями криопротекторов на этапе экспозиции до сих пор не был описан в литературе. Механизм защитного действия ПВС может быть обусловлен его связыванием с мембраной клеток, что повышает их устойчивость к токсическому действию высоких концентраций криопротекторов.

Вопрос насыщения биологического объекта витрифицирующимся раствором является открытым, особенно в случае ТИК. Продолжительность насыщения должна быть оптимальной, чтобы минимизировать контакт клеток с токсичными концентрациями криопротекторов и не допустить образования ненасыщенных областей МПМ. Для насыщения ТИК часто применяют перенос в растущем градиенте концентраций криопротекторов [13, 26]. Такой подход основан на пассивной диффузии и не всегда обеспечивает равномерное проникновение и распределение раствора в матрице. В нашей работе для насыщения МПМ растворами криопротекторов применяли перфузионный метод. Чтобы определить, какой из указанных способов насыщения является более щадящим для МСК, мы моделировали их на суспензии клеток. После насыщения раствором ДЭПС 15/20/20 с 1% ПВС и удаления криопротекторов показатель жизнеспособности МСК при использовании перфузионного метода снижался на 10%, а при переносе в растворы с возрастающей концентрацией криопротекторов – на 20% по сравнению с контрольной группой (рис. 6, А). После витрификации этот показатель был ниже контроля на 20% при применении перфузионного метода и на 25% – при переносе в градиенте концентраций криопротекторов. Анализ метабо-

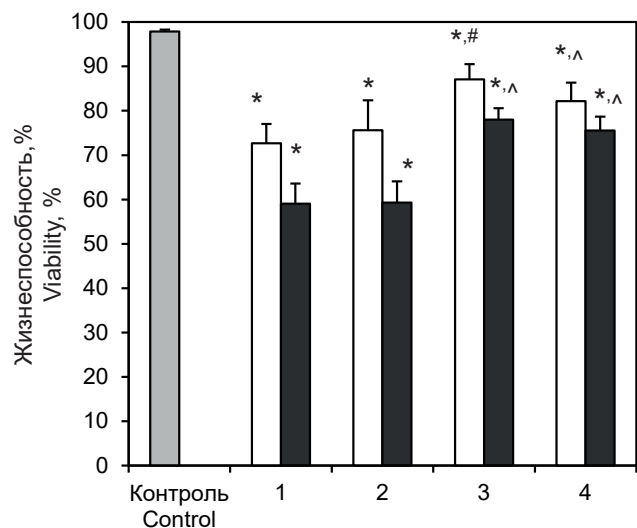


Рис. 5. Жизнеспособность МСК в составе суспензии после экспозиции (□) и последующей витрификации (■) под защитой растворов ДЭПС 15/20/20 без и с добавлением СБЛ ($n = 6$). 1 – без СБЛ; 2 – 1% ПЭГ 8000; 3 – 1% ПВС; 4 – 1% ПВС + 1% ПЭГ 8000. Различия статистически значимы по сравнению с контролем (*); с экспозицией в растворе без СБЛ (#); с витрификацией в растворе без СБЛ (^), $p < 0,05$.

Fig. 5. Viability of MSCs in suspension after exposure (□) and subsequent vitrification (■) under protection of DEPS 15/20/20 solutions without and with SIBs ($n = 6$). 1 – without SIBs; 2 – 1% PEG 8000; 3 – 1% PVA; 4 – 1% PVA + 1% PEG 8000. Differences are statistically significant if compared with control (*); exposure in solution without SIBs (#); vitrification in solution without SIBs (^), $p < 0.05$.

In order to minimize cracking, we evaluated the effect of various cooling and warming regimes on the structure integrity of a vitrified sample (MPM in a 15/20/20 DEPS solution with 1% PVA). In Fig. 4A, it can be seen that during one-stage cooling (immersion in liquid nitrogen), a cracking of the formed glassy phase occurred. The subsequent one-stage warming intensified the cracking process (Fig. 4B). The two-stage cooling regime developed using the previously obtained temperature characteristics of the initial DEPS solution [22] prevented cracking (Fig. 4C). In this case, the stability of the glassy phase was obviously ensured by a rapid decrease in temperature at the first stage, overcoming the critical temperature range in which ice crystals can form, and a slow transition to a solid amorphous state through T_g at the second stage, sufficient in time for relaxation of thermo-mechanical stresses. During the subsequent two-stage warming, no cracking was observed (Fig. 4D).

When choosing the conditions ensuring the preservation of the MPM structure during vitrification, it is necessary to take into account their effect on the state of cells in the TEC. In this regard, the viability of the MSC suspension was studied



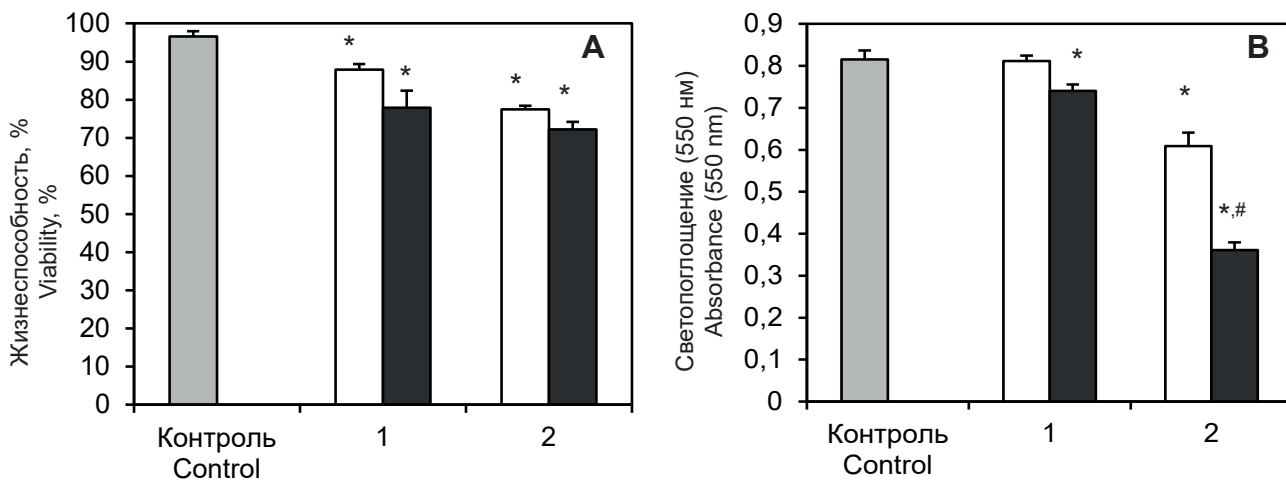


Рис. 6. Влияние способа насыщения раствором криопротекторов на жизнеспособность (А) и метаболическую активность (В) МСК после экспозиции (□) и последующей витрификации (■) в составе суспензии ($n = 6$). 1 – перфузионный метод; 2 – перенос в градиенте концентраций. Различия статистически значимы по сравнению с контролем (*); с экспозицией в растворе криопротекторов (#), $p < 0,05$.

Fig. 6. Effect of method of saturation with cryoprotectant solution on viability (А) and metabolic activity (В) of MSCs after exposure (□) and subsequent vitrification (■) in suspension ($n = 6$). 1 – perfusion; 2 – transfer in concentration gradient. Differences are statistically significant if compared with control (*); exposure in solution of cryoprotectants (#), $p < 0.05$.

лической активности клеток позволил выявить еще большие различия в эффективности двух способов насыщения. Так, после экспозиции с раствором криопротекторов метаболическая активность в случае применения перфузионного метода не отличалась от показателя контрольной группы, а при насыщении путем переноса в растворы с возрастающей концентрацией криопротекторов снижалась на 10% (рис. 6, В). После витрификации отличия проявлялись в еще большей степени: метаболическая активность при насыщении перфузионным методом была ниже на 25%, а при переносе в растущем градиенте концентраций криопротекторов – на 55% по сравнению с контролем. Приведенные данные показывают, что насыщение с использованием перфузионного метода оказывает менее повреждающее действие на МСК.

При витрификации МСК, заселенных в МПМ, с применением перфузионного метода насыщения также удалось получить более высокие показатели сохранности, чем при переносе в градиенте концентраций криопротекторов (рис. 7). Однако жизнеспособность МСК после витрификации резко снижалась и составляла $(20,2 \pm 6,5)\%$. При этом жизнеспособность после экспозиции с раствором криопротекторов не отличалась от контрольной группы. Полученные данные свидетельствуют о том, что гибель клеток при витрификации в составе МПМ происходит не вследствие токсического действия криопротекторов, а, очевидно, в результате развития не выявляемой визуально внутриклеточной кристаллизации на этапах охлаждения-отогрева.

at different stages of vitrification using modified solutions and two-stage cooling-warming modes. After exposure of MSCs in DEPS 15/20/20 solutions without and with the addition of 1% PEG-8000, a 20% decrease in viability for trypan blue staining was noted in comparison with the control (Fig. 5). After exposure in a solution supplemented with 1% PVA, viability decreased to a lesser extent (10%) and was significantly higher ($p < 0.05$) than in a solution without additives. After vitrification under the protection of DEPS 15/20/20 without SIBs and with 1% PEG-8000, the MSC viability was lower by 40%, and with 1% PVA – by 20% with respect to the control (Fig. 5). Thus, the addition of 1% PVA to the solution of cryoprotectants allows a higher preservation rate of the viability of MSCs both after exposure and after vitrification. The protective effect of PVA upon contact of cells with high cryoprotectant concentrations at the exposure stage has not yet been reported. The mechanism of the protective action of PVA may be due to its binding to the cell membrane, which increases their resistance to the toxic effect of high concentrations of cryoprotectants.

The issue of saturation of the specimen with a vitrification solution has remained open, especially for the TECs. The saturation duration should be optimal in order to minimize the contact of cells with toxic concentrations of cryoprotectants and to prevent the formation of unsaturated MPM regions. To saturate the TECs, transfer in a growing gradient of cryoprotectant concentrations is often used [13, 26]. This approach is based on a pas-



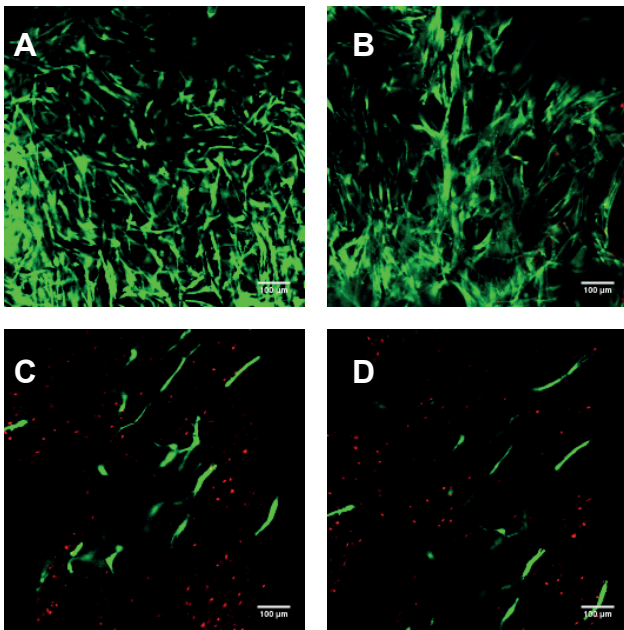


Рис. 7. Распределение и жизнеспособность МСК в составе МПМ: контрольная группа (А), экспозиция в растворе криопротекторов (В), витрификация после насыщения путем переноса в градиенте концентраций (С), витрификация после насыщения перфузионным методом (D) Конфокальная флуоресцентная микроскопия, окрашивание FDA/ЭБ.

Fig. 7. Distribution and viability of MSCs in MPM: control group (A), exposure with cryoprotective solution (B), vitrification after saturation by transfer in concentration gradient (C), vitrification after saturation by perfusion method (D). Confocal fluorescent microscopy, FDA/EB staining.

Ранее нами было показано [22], что после витрификации МСК в составе альгинатных микросфер, где клетки находятся в гелевой матрице того же состава, что и использованная в настоящей работе МПМ (альгинат), но в неадгезивном состоянии и без межклеточных контактов, резкого снижения жизнеспособности не наблюдалось. В совокупности полученные результаты позволяют предположить, что взаимодействие клеток друг с другом и с поверхностью пор способствует развитию кристаллизации при витрификации МСК в составе МПМ. Данное предположение согласуется с данными об индукции внутриклеточной кристаллизации за счет межклеточных контактов и более высокой чувствительности к действию факторов криоконсервирования клеток, адгезированных на поверхности, полученных с использованием культур фибробластов [1] и HepG2 [10].

В настоящей работе сделан шаг к созданию технологии витрификации ТИК на основе макропористых матриц и МСК в закрытой системе относительно большого объема – стандартных криобирках. Определена совокупность ус-

сive diffusion and does not always ensure uniform penetration and distribution of the solution in matrix. In our research the perfusion method was used to saturate the MPM with cryoprotectant solutions. To determine which of these saturation methods is more mild for MSCs, we simulated them in a cell suspension. After saturation with DEPS 15/20/20 with 1% PVA and removal of cryoprotectants, the MSC viability index in case of the perfusion method decreased by 10%, and in case of transfer in gradient of concentration model by 20% compared with the control group (Fig. 6A). After vitrification this index was lower than the control by 20% when using the perfusion method model and by 25% for transfer in gradient of concentration model. Analysis of the metabolic activity of the cells revealed even greater differences in the effectiveness of the two saturation methods. So, after exposure to a solution of cryoprotectants, the metabolic activity in the case of applying the perfusion method did not differ from that of the control group, and when saturated by transferring to solutions with an increasing concentration gradient of cryoprotectants, it decreased by 10% (Fig. 6B). After vitrification, the differences were even more pronounced: metabolic activity when saturated with the perfusion method was 25% lower, and when transferred in gradient of cryoprotectant concentrations, by 55% compared with the control. The data presented show that saturation using the perfusion method has a less damaging effect on MSCs.

By vitrifying MSCs seeded in the MPM using the perfusion saturation method, it was also possible to obtain higher safety indices than for transfer in a concentration gradient (Fig. 7). However, the viability of MSCs after vitrification sharply decreased and amounted to $(20.2 \pm 6.5)\%$. In this case, the viability after exposure to a solution of cryoprotectants did not differ from the control group. The data obtained indicate that cell death during vitrification as part of the MPM does not occur due to the toxic effects of cryoprotectants, but, obviously, as a result of the development of visually undetectable intracellular crystallization at the cooling-warming stages.

We previously showed [22] that after vitrification of MSCs as part of alginate microspheres, where the cells are in a gel matrix of the same composition as the MPM (alginate) used in this work, but in a non-adhesive state and without intercellular contacts, a sharp decrease in viability was not observed. Collectively, the results suggest that the interaction of cells with each other and with the pore surface contributes to the development of crystallization during vitrification of MSCs as

ловий, необхідних для витрифікації розчину зовні і всередині МПМ без утворення кристалів льда і тріщин в ході охолодження і отогрева. Вибрані умови витрифікації показали достаточними для збереження життєспроможності і метаболічної активності МСК в суспензії. В той же час клітини, що ростуть на поверхні пор МПМ впродовж 7 днів, успішно пережили експозицію в витрифікуючому розчині, але не наступне охолодження і отогрев. Отримані результати свідчать про принципову можливість криоконсервування тканинних конструкцій методом витрифікації і звужують коло подальших досліджень, спрямованих на розробку безпечних і ефективних методів їх зберігання для наступного клінічного застосування.

Висновки

1. В роботі визначені умови витрифікації (склад криозащитного розчину, методи насичення, режими охолодження-отогрева і видалення криопротекторів), які дозволяють упередити растрескивання склоподібної фази і утворення кристалів льда в макропористих матрицях.

2. Вибрані умови забезпечують високу життєспроможність МСК після криоконсервування шляхом витрифікації в складі суспензії, але потребують подальшого удосконалення для збереження клітин в складі тканинних конструкцій.

Література

1. Acker J, Larese A, Yang H, et al. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology*. 1999; 38(4): 363–71.
2. Baudot A, Alger L, Boutron P. Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. 2000; 40(2): 151–8.
3. Baudot A, Odagescu V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. *Cryobiology*. 2004; 48(3): 283–94.
4. Catry J, Luong-Nguyen M, Arakelian L, et al. Circumferential esophageal replacement by a tissue-engineered substitute using mesenchymal stem cells: an experimental study in mini pigs. *Cell Transplant*. 2017; 26(12): 1831–9.
5. Chen D, Gelenter MD, Hong M, et al. Icephobic surfaces induced by interfacial nonfrozen water. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017; 9(4): 4202–14.
6. Dankberg F, Persidsky MD. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function. *Cryobiology*. 1976; 13(4): 430–2.
7. Day AGE, Bhangra KS, Murray-Dunning C. The effect of hypothermic and cryogenic preservation on engineered neural tissue. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017; 23(10): 575–82.
8. Flaxman BA. Cell identification in primary cell cultures from skin. *In vitro*. 1974; 10(1-2): 112–8.

part of the MPM. This assumption is consistent with the data on the induction of intracellular crystallization due to intercellular contacts and higher sensitivity to the action of cryopreservation factors of cells adhered to the surface obtained using fibroblast cultures [1] and HepG2 [10].

In this work, we have stepped towards creating the vitrification technique for the TECs based on macroporous matrices and MSCs in a closed system of relatively large volume, *i. e.* standard cryovials. The set of conditions necessary for vitrification of the solution outside and inside the MPM without the formation of ice crystals and cracks during cooling and warming is determined. The selected vitrification modes were sufficient to maintain the viability and metabolic activity of MSCs in suspension. At the same time, the cells growing on the pore surface of MPM for 7 days successfully survived exposure in a vitrifying solution, but not subsequent cooling and warming. The results obtained indicate the fundamental possibility of cryopreservation of tissue-engineering structures by the method of vitrification and narrow the scope of further research aimed at developing safe and effective methods for their storage for subsequent clinical use.

Conclusions

1. The vitrification conditions (composition of a cryoprotective solution, saturation methods, cooling-warming and cryoprotectant removal modes), which prevent cracking of a glassy phase and formation of ice crystals in macroporous matrices, were determined.

2. The selected conditions ensured a high viability of MSCs after cryopreservation by vitrification in the suspension, but required further improvement to preserve the cells in the tissue-engineering constructs.

References

1. Acker J, Larese A, Yang H, et al. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology*. 1999; 38(4): 363–71.
2. Baudot A, Alger L, Boutron P. Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. 2000; 40(2): 151–8.
3. Baudot A, Odagescu V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. *Cryobiology*. 2004; 48(3): 283–94.
4. Catry J, Luong-Nguyen M, Arakelian L, et al. Circumferential esophageal replacement by a tissue-engineered substitute using mesenchymal stem cells: an experimental study in mini pigs. *Cell Transplant*. 2017; 26(12): 1831–9.
5. Chen D, Gelenter MD, Hong M, et al. Icephobic surfaces induced by interfacial nonfrozen water. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017; 9(4): 4202–14.



9. Fritsch K, Pigeot S, Feng X, et al. Engineered humanized bone organs maintain human hematopoiesis *in vivo*. *Exp Hematol*. 2018; 61: 45–51.
10. Irimia D, Karlsson J. Kinetics and mechanism of intercellular ice propagation in a micropatterned tissue construct. *Biophys J*. 2002; 82(4): 1858–68.
11. Kravchenko LP, Petrenko AY, Somov AY, et al. Respiratory activity of isolated rat hepatocytes following cold storage and subsequent rewarming: A comparison of sucrose-based and University of Wisconsin solutions. *Cryobiology*. 2001; 42 (3): 218–21.
12. Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, et al. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*. 1999; 38(2): 119–30.
13. Lawson A, Mukherjee IN, Sambanis A. Mathematical modeling of cryoprotectant addition and removal for the cryopreservation of engineered or natural tissues. *Cryobiology*. 2012; 64(1): 1–11.
14. MacFarlane DR, Forsyth M, Barton CA. Vitrification and devitrification in cryopreservation. In: Steponkus PL, editor. *Advances in Low-Temperature Biology*. London: JAI Press; 1991. Vol. 1. p. 221–77.
15. Mehl PM. Nucleation and crystal growth in a vitrification solution tested for organ cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*. 1993; 30(5): 509–18.
16. Petrenko YA, Ivanov RV, Lozinsky VI, et al. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers. *Bull Exp Biol Med*. 2011; 150(4): 543–6.
17. Petrenko YA, Ivanov RV, Petrenko AY, et al. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2011; 22(6): 1529–40.
18. Riss T, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. In: *Assay Guidance Manual* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2018 May 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
19. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. 1976; 13: 29–83.
20. Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, et al. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology*. 199; 35(3): 219–29.
21. Steif PS, Palastro M, Wen CR, et al. Cryomicroscopy of vitrification, Part II: Experimental observations and analysis of fracture formation in vitrified VS55 and DP6. *Cell Preserv Technol*. 2005; 3(3): 184–200.
22. Trufanova NA, Zaikov VS, Zinchenko AV, et al. Closed vitrification system as a platform for cryopreservation of tissue engineered constructs. *Cryo Letters*. 2016; 37(6): 440–7.
23. Wen F, Magalhães R, Gouk SS, et al. Vitreous cryopreservation of nanofibrous tissue-engineered constructs generated using mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009; 15(1): 105–14.
24. Wovk B, Leidl E, Rash CM, et al. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*. 2000; 40(3): 228–36.
25. Wovk B. Roles of ice-active agents in organ cryopreservation. *Cryobiology*. 2015; 71(1): 172–3.
26. Wu Y, Yu H, Chang S, et al. Vitreous cryopreservation of cell-biomaterial constructs involving encapsulated hepatocytes. *Tissue Eng*. 2007; 13(3): 649–58.
6. Dankberg F, Persidsky MD. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function. *Cryobiology*. 1976; 13(4): 430–2.
7. Day AGE, Bhangra KS, Murray-Dunning C. The effect of hypothermic and cryogenic preservation on engineered neural tissue. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017; 23(10): 575–82.
8. Flaxman BA. Cell identification in primary cell cultures from skin. *In vitro*. 1974; 10(1-2): 112–8.
9. Fritsch K, Pigeot S, Feng X, et al. Engineered humanized bone organs maintain human hematopoiesis *in vivo*. *Exp Hematol*. 2018; 61: 45–51.
10. Irimia D, Karlsson J. Kinetics and mechanism of intercellular ice propagation in a micropatterned tissue construct. *Biophys J*. 2002; 82(4): 1858–68.
11. Kravchenko LP, Petrenko AY, Somov AY, et al. Respiratory activity of isolated rat hepatocytes following cold storage and subsequent rewarming: A comparison of sucrose-based and University of Wisconsin solutions. *Cryobiology*. 2001; 42 (3): 218–21.
12. Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, et al. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*. 1999; 38(2): 119–30.
13. Lawson A, Mukherjee IN, Sambanis A. Mathematical modeling of cryoprotectant addition and removal for the cryopreservation of engineered or natural tissues. *Cryobiology*. 2012; 64(1): 1–11.
14. MacFarlane DR, Forsyth M, Barton CA. Vitrification and devitrification in cryopreservation. In: Steponkus PL, editor. *Advances in Low-Temperature Biology*. London: JAI Press; 1991. Vol. 1. p. 221–77.
15. Mehl PM. Nucleation and crystal growth in a vitrification solution tested for organ cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*. 1993; 30(5): 509–18.
16. Petrenko YA, Ivanov RV, Lozinsky VI, et al. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers. *Bull Exp Biol Med*. 2011; 150(4): 543–6.
17. Petrenko YA, Ivanov RV, Petrenko AY, et al. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2011; 22(6): 1529–40.
18. Riss T, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. In: *Assay Guidance Manual* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2018 May 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
19. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. 1976; 13: 29–83.
20. Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, et al. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology*. 199; 35(3): 219–29.
21. Steif PS, Palastro M, Wen CR, et al. Cryomicroscopy of vitrification, Part II: Experimental observations and analysis of fracture formation in vitrified VS55 and DP6. *Cell Preserv Technol*. 2005; 3(3): 184–200.
22. Trufanova NA, Zaikov VS, Zinchenko AV, et al. Closed vitrification system as a platform for cryopreservation of tissue engineered constructs. *Cryo Letters*. 2016; 37(6): 440–7.
23. Wen F, Magalhães R, Gouk SS, et al. Vitreous cryopreservation of nanofibrous tissue-engineered constructs generated using mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009; 15(1): 105–14.
24. Wovk B, Leidl E, Rash CM, et al. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*. 2000; 40(3): 228–36.
25. Wovk B. Roles of ice-active agents in organ cryopreservation. *Cryobiology*. 2015; 71(1): 172–3.
26. Wu Y, Yu H, Chang S, et al. Vitreous cryopreservation of cell-biomaterial constructs involving encapsulated hepatocytes. *Tissue Eng*. 2007; 13(3): 649–58.

