

УДК 576.371:612.419:57.085.23:57.043

Д.Н. Тарусин^{*1}, В.А. Киреев², С.Е. Коваленко², И.Ф. Коваленко², Л.Ф. Розанов², А.Ю. Петренко¹

Выбор условий криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток в суспензии и альгинатных микросферах на основе изучения их осмотических реакций в растворе 1 М ДМСО

UDC 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

D.N. Tarusin^{*1}, V.A. Kireyev², S.Ye. Kovalenko², I.F. Kovalenko², L.F. Rozanov², A.Yu. Petrenko¹

Selection of Protocols to Cryopreserve Mesenchymal Stromal Cells in Suspension and Alginate Microspheres by Studying Their Osmotic Responses in 1M DMSO

Реферат: Исследовали осмотическую реакцию мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в суспензии и альгинатных микросферах (АМС) в процессе экспозиции в 1 М растворе ДМСО, а также их жизнеспособность после криоконсервирования с разной скоростью охлаждения. Путем численного моделирования определены коэффициенты проницаемости мембран МСК для молекул воды и ДМСО, а также изменение объема клеток при разных скоростях охлаждения. Показано, что охлаждение со скоростями 0,5 и 1 град/мин до -40°C приводило к существенной дегидратации клеток. Осмотическая реакция МСК в составе АМС была медленнее, чем в суспензии, что приводило к снижению их жизнеспособности после криоконсервирования со скоростью охлаждения 1 град/мин. При скорости охлаждения 10 град/мин клетки практически не обезвоживались, что предполагало высокую вероятность внутриклеточной кристаллизации. Действительно, если жизнеспособность МСК в суспензии и АМС после криоконсервирования с 1 М ДМСО со скоростями охлаждения 0,5 и 1 град/мин составляла не менее 75%, то криоконсервирование со скоростями охлаждения 10 и 20 град/мин приводило к гибели около 80% клеток. Теоретический расчет и экспериментальные исследования показали, что для достижения высоких уровней жизнеспособности криоконсервирование МСК в составе АМС необходимо осуществлять с более низкими скоростями охлаждения, чем клеток в суспензии.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, альгинатные микросферы, коэффициент проницаемости, физико-математическая модель.

Реферат: Досліджували осмотичну реакцію мезенхімальних стромальних клітин (МСК) у суспензії та альгінатних микросферах (АМС) у процесі експозиції в 1 М розчині ДМСО, а також їх життєздатність після криоконсервування з різною швидкістю охолодження. Шляхом чисельного моделювання визначено коефіцієнт проникності мембран МСК для молекул води та ДМСО, а також зміну об'єму клітин при різних швидкостях охолодження. Показано, що охолодження зі швидкостями 0,5 та 1 град/хв до -40°C призводило до значної дегідратації клітин. Осмотична реакція МСК у складі АМС була повільніша, ніж у суспензії, що призводило до зниження їх життєздатності після криоконсервування зі швидкістю охолодження 1 град/хв. При швидкості охолодження 10 град/хв клітини практично не зневоднювалися, що передбачало високу ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації. Дійсно, якщо життєздатність МСК у суспензії та АМС після криоконсервування з 1 М ДМСО зі швидкостями охолодження 0,5 та 1 град/хв становила не менше 75%, то криоконсервування зі швидкостями охолодження 10 та 20 град/хв призводило до загибелі близько 80% клітин. Теоретичний розрахунок і експериментальні дослідження показали, що для досягнення високих рівнів життєздатності криоконсервування МСК у складі АМС необхідно здійснювати з більш низькими швидкостями охолодження, ніж клітин у суспензії.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, альгінатні микросфери, коефіцієнт проникності, фізико-математична модель.

Abstract: We studied the osmotic reaction of mesenchymal stromal cells (MSCs) in suspension and alginate microspheres (AMSs) during their exposure to 1 M solution of DMSO and their viability after cryopreservation with different cooling rates. Numerical modeling allowed to find the permeability coefficient of MSCs membrane for water and DMSO molecules and a change in cell volume at different cooling rates. The cooling rates of 0.5 to 1 deg/min down to -40°C have been shown to result in a substantial dehydration of the cells. The osmotic reaction of MSCs in AMSs was slower than of cells in a suspension, and resulted in a reduced post-thaw viability if cooling rate was 1 deg/min. If the rate was 10 deg/min the cells were not sufficiently dehydrated, highly suggesting a probable intracellular crystallization. Indeed, if the viability of MSCs in the suspension and AMSs after cryopreservation with 1 M DMSO at a cooling rate of 0.5 and 1 deg/min was as much as 75%, the cryopreservation with cooling rates of 10 and 20 deg/min, resulted in the death of about 80% of the cells. Theoretical calculations and experimental studies have shown that to achieve the high levels of viability of MSCs in AMSs the cryopreservation should be implemented with lower cooling rates than for the cells in suspension.

Key words: mesenchymal stromal cells, alginate microspheres, permeability coefficient, physico-mathematical model.

¹Отдел криобиохимии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Отдел низкотемпературного консервирования, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

***Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:**
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: tarusindmitriy@gmail.com

Поступила 21.03.2016

Принята в печать 18.05.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №2. – С. 133–144.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Department of Cryobiochemistry, and

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

***To whom correspondence should be addressed:**
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: tarusindmitriy@gmail.com

Received March, 21, 2016

Accepted May, 18, 2016

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2016. 26(2): 133–144.

© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) могут быть получены из разных тканей взрослого организма не нарушая этических норм и применяться *in vivo* без иммунологических проблем. Очевидное преимущество МСК заключается в их способности дифференцироваться в ряд соматических клеточных линий. Поэтому является перспективным использование МСК в области регенеративной медицины для лечения ряда заболеваний и патологических состояний пациента [2, 11].

Тканевая инженерия – мультидисциплинарное активно развивающееся направление биотехнологии, которое заключается в создании биоинженерных конструкций для последующего восстановления поврежденных тканей пациента [23]. Данное направление основано на выращивании клеток *in vitro* с использованием трехмерных носителей из материалов природного и искусственного происхождения. Одним из перспективных материалов для изготовления носителей является альгинат – линейный природный полисахарид, состоящий из последовательных или чередующихся GG/GM/MM-блоков β -D-манурановой (M) и α -L-гиалурановой (G) кислот [29]. Альгинат натрия способен формировать пористый гидрогель за счет поперечного связывания GG/GM-блоков (GG-GG; GM-GG; GM-GM) между собой посредством дивалентных катионов, таких как Ca^{2+} , Br^{2+} или Sr^{2+} [12, 22]. Подобный пористый гидрогель обеспечивает барьерные функции в отношении крупных макромолекул и создает вокруг клеток специфическое микроокружение, максимально приближенное к естественным условиям их существования [15].

Метод заключения клеток в альгинатные микросферы (АМС) впервые был описан в работах F. Lim и A. Sun еще в 1980-х годах [20]. В настоящее время этот подход широко применяется для иммобилизации ряда клеток, в частности МСК, с целью их последующего применения для заместительной терапии костных и хрящевых тканей [14, 28]. Кроме того, тканеинженерные конструкции на основе МСК используются в качестве тест-систем для скрининга лекарственных препаратов, создания клеточных моделей болезней и выращивания биомассы в биореакторах [16, 19, 21].

Поскольку МСК, заключенные в АМС, широко применяются в современной медицине, то возникает потребность в их долгосрочном хранении и транспортировке. Для криоконсервирования суспензии МСК обычно применяют режимы, включающие медленное замораживание с последующим погружением в жидкий азот под защитой криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрации 5–10% [5, 9]. Однако технологии, разработанные для криоконсервирования клеточ-

Mesenchymal stromal cells (MSCs) can be derived from various adult tissues with no violating the ethical standards and applied *in vivo* without emerging immunological conflicts. The obvious advantage of MSCs is their ability to differentiate into a several somatic cell lines. Therefore, it is promising to use MSCs in regenerative medicine to treat some diseases and pathologies in a patient [5, 29].

Tissue engineering is a multidisciplinary, actively developing branch of biotechnology, which objective is to create a bioengineered constructs to restore the damaged tissues of a patient [16]. This direction is based on *in vitro* culturing the cells using the three-dimensional carriers made of the materials of natural and artificial origins. One of the most promising materials to produce the carriers is alginate, which is linear natural poly-saccharide composed of alternating or consecutive GG/GM-blocks of β -D-mannuronic (M) and α -L-hyaluronic (G) acids [28]. Sodium alginate is able to form a porous hydrogel by cross-linking of GG/GM/MM-blocks (GG-GG; GM-GG; GM-GM) between each other by divalent cations such as Ca^{2+} , Br^{2+} or Sr^{2+} [2, 15]. Such a porous hydrogel acts as a barrier for large macromolecules and creates a specific microenvironment around the cells, as close as possible to their natural habitat [7].

Method of encapsulation of the cells into alginate microspheres (AMS) was for the first time reported by F. Lim and A. Sun in the 1980s [13]. Currently, this approach is widely used to immobilize a variety of cells, e.g. MSCs, and to apply them thereafter in a substitutive therapy as bone and cartilage tissues analogues [6, 24]. In addition, the tissue-engineered constructs are used as test systems for screening the drugs, designing of cell models of diseases and growing biomass in bioreactors [8, 12, 14].

Since the MSCs enclosed into AMS are widely used in current medicine, there is a need for their long-term storage and transportation. Cryopreservation of MSCs suspension usually involves the protocols based on slow freezing, followed by an immersion into liquid nitrogen under protection of 5–10% dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotective agent [20, 27]. However, the techniques developed to cryopreserve cell suspensions may not be suitable for the cells encapsulated in the AMS, since they do not consider spatial arrangement of alginate hydrogel, affecting the diffusion and redistribution of substances in the AMS-environment system [3]. The attempts were made previously to cryopreserve MSCs inside of AMS at various freezing conditions succeeded for both cell preservation and integrity of the matrix itself [10, 22]. However, it has remained an urgent task to find the most optimal freezing conditions for MSCs, encapsulated into AMS, which would take into account the presence of three-dimensional alginate hydrogel.



ных суспензий, могут не подходить для клеток, заключенных в АМС, поскольку они не учитывают пространственной организации альгинатного гидрогеля, который влияет на диффузию и перераспределение веществ в системе «АМС-окружающая среда» [13]. Ранее уже были предприняты попытки криоконсервирования МСК в составе АМС при различных режимах замораживания, что позволило добиться положительных результатов в отношении как сохранности клеток, так и целостности самой матрицы [6, 17]. Однако остается актуальным поиск наиболее оптимальных режимов замораживания МСК, заключенных в АМС, которые учитывали бы присутствие трехмерного альгинатного гидрогеля.

В связи с этим целью данной работы было определение морфометрических и транспортных характеристик МСК в суспензии и альгинатных микросферах в 1 М растворе ДМСО, теоретическое моделирование процессов дегидратации клеток при различных режимах замораживания, а также сопоставление результатов моделирования с экспериментальными результатами криоконсервирования.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на МСК дермы взрослого человека, которые были получены согласно общепринятым биоэтическим нормам. Клетки выделяли методом эксплантации кусочков кожи [4]. Клетки культивировали в среде α -MEM («РАА», Австрия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (ЭС) («РАА»), 1% антибиотика (50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина) при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Замену среды проводили каждые 3–4 суток. При достижении клетками 70%-го конфлюэнта их пассировали по стандартной методике с использованием смеси трипсин/версен в соотношении 1:4 и пересеивали с плотностью посева 5 000 кл/см² [24]. В последующих экспериментах использовали культуры МСК 4–8 пассажей. Клетки снимали, как описано выше, осаждали путем центрифугирования при 150g в течение 7 мин (в дальнейшем скорость и время центрифугирования не изменялись), промывали средой, содержащей 0,15 М NaCl и 25 мМ HEPES (pH 7,4), и суспендировали в культуральной среде.

В работе использовали альгинат натрия («Sigma-Aldrich», США), выделенный из бурых водорослей, с высоким содержанием маннурановой кислоты и низкой вязкостью (250 сП). Перед началом работы готовили 2%-й раствор альгината натрия на растворе Хэнкса (pH 7,4) с последующей его стерилизацией путем ступенчатой фильтрации через серию фильтров с уменьшающимся размером пор (0,65; 0,45; 0,22 мкм).

Therefore the aim of this research was to determine morphometric and transport features of MSCs in suspension and alginate microspheres after transferring them into 1M DMSO solution, to perform theoretical modeling of cell dehydration at various freezing conditions, as well as to compare the outcome of the simulation and experimental results of cryopreservation.

Materials and methods

Experiments were performed in human adult dermal MSCs procured according to conventional bioethical standards. The cells were isolated by explanting the skin fragments [4]. Cells were cultured in α -MEM (PAA, Austria) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (PAA), 1% antibiotic (50 IU/ml Penicillin and 50 μ g/ml Streptomycin) at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. The medium was replaced every 3–4 days. Once the cells reached 70% confluency they were passaged by a standard procedure using the trypsin/versene mixture (1:4 ratio) and inoculated with a seeding density of 5,000 cells/cm² [17]. In subsequent experiments we used the MSCs cultures after 4–8 passages. The cells were detached as described above, pelleted by centrifugation at 150g for 7 min (hereinafter, the rate and time of centrifugation were the same), rinsed with medium containing 0.15 M NaCl and 25 mM HEPES (pH 7.4), and suspended in the culture medium.

We used sodium alginate (Sigma-Aldrich, USA), isolated from brown seaweed, with a high content of mannuronic acid and low viscosity (250 cPs). Before the experiments we prepared 2% sodium alginate solution in Hanks' medium (pH 7.4), and sterilized it by filtration through a series of filters with decreasing pore size (0.65; 0.45; 0.22).

To form the AMS of the fixed size ((250 \pm 20) μ m) we applied high voltage encapsulation method [11]. Uniform spraying to form homogeneous AMS was provided under the following parameters: 10 ml/hr alginate solution extrusion speed, 4 cm spray height, ~4 kV applied voltage, concentration of sodium alginate and CaCl₂ was 2% and 100 mM, respectively.

The cell suspension was pelleted by centrifugation, the pellet was suspended in 1 ml of 2% purified sodium alginate (1.5 \times 10⁶ cells/ml). Then, the sodium alginate, containing the cell suspension was placed into a sterile 1 ml syringe with a 0.33 mm diameter needle and sprayed into a 100 mM CaCl₂ solution wherein the AMS were left for 10 min for polymerization. Afterwards the stepwise rinsing of MS from excessive calcium ions was performed with a washing solution. To normalize cell functions the AMS were subjected to 1 day culturing as described above. The shape and size of the obtained AMS were assessed by microscope.



Для формирования АМС фиксированного размера (250 ± 20) мкм использовали метод инкапсуляции с применением высокого напряжения [18]. Равномерное распыление с формированием однородных АМС обеспечивалось при соблюдении следующих параметров: скорость выдавливания раствора альгината – 10 мл/ч, высота распыления – 4 см, приложенное напряжение – ~4 кВ, концентрация альгината натрия и CaCl_2 – 2% и 100 мМ соответственно.

Суспензию клеток осаждали центрифугированием, осадок суспендировали в 1 мл очищенного 2%-го альгината натрия ($1,5 \times 10^6$ кл/мл). Затем альгинат натрия, содержащий суспензию клеток, помещали в стерильный шприц объемом 1 мл с диаметром иглы 0,33 мм и распыляли в 100 мМ раствор CaCl_2 , в котором оставляли АМС на 10 мин для полимеризации. После этого проводили ступенчатую отмывку АМС от избытка ионов кальция промывочным раствором. Для нормализации клеточных функций АМС на сутки помещали в условия культивирования, описанные выше. Форму и размер полученных АМС оценивали микроскопическим методом.

Определение влияния заключения в АМС на транспортные характеристики МСК проводили методом волюмометрии [1], сопоставляя экспериментально полученные зависимости объема клеток от времени их контакта с 1 М раствором ДМСО, содержащим изотоническую концентрацию хлористого натрия, с решениями теоретической модели. Относительный объем клетки $V(t)/V_0$ (где $V(t)$ – объем клетки в момент времени t , V_0 – исходный объем клетки) определяли путем измерения диаметров изображений клеток, полученных с помощью микроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия). Диаметр (d) клеток измеряли, используя программу «AxioVision 4.8» («Carl Zeiss»).

При контакте клетки с раствором проникающего вещества (криопротектора) изменения ее объема (V) и концентраций растворенных вне и внутри ее веществ во времени описывает система дифференциальных уравнений [3]:

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

где t – время; S и L_p – площадь поверхности и коэффициент фильтрации мембраны; π_1^{out} и π_1^{in} –

The effect of encapsulation into AMS on the transport parameters of MSCs was examined volumetrically [1], by means of fitting the experimentally obtained dependences of cell volume vs. the time of their contact with a 1 M solution of DMSO containing isotonic concentration of sodium chloride and the curves being the solutions of the theoretical model. Normalized cell volume $V(t)/V_0$ (where $V(t)$ was cell volume at time t , V_0 was initial cell volume) was determined by measuring the diameter of cell images obtained with a microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany). The diameter (d) of cells was measured using the software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss).

The contact of a cell with the solution of penetrating substance (cryoprotective agent) is accompanied with the time dependent changes of its volume (V) and the concentrations of the dissolved substances outside and inside the cell which could be described by the system of differential equations [3]:

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

where t – time; S and L_p – surface area and filtration coefficient of membrane; π_1^{out} and π_1^{in} – osmotic pressures of substance penetrating across through plasma membrane substance outside and inside the cell, respectively; π_2^{out} and π_2^{in} – total osmotic pressures of the substance non-penetrating through the plasma membrane outside and inside the cell, respectively; Δp – hydrostatic pressure differential on cell membrane; K_1 and σ_1 – coefficients of permeability and reflection of the plasma membrane for the substance penetrating through the membrane, respectively; π_{20}^{in} and V_0 – initial values of total osmotic pressure of non-penetrating substances inside a cell and its initial volume, respectively; α – volume of osmotically inactive intracellular substances (for MSC $\alpha = 0.367$).

The transition to dimensionless quantities brings the equation (1) to the form:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[\sigma_1 (\pi_1^{in} - \pi_1^{out}) + \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} - 1 \right] \\ \frac{d\pi_1^{out}}{dt} = - \frac{1}{\tau_1} \left[(\pi_1^{in} - \pi_1^{out}) + \sigma_1 \pi_1^{in} \frac{dy}{dt} \right] \frac{1}{y - \alpha} \\ \pi_2^{in} = \pi_2^{in}(0) \left(\frac{1 - \alpha}{y - \alpha} \right) \end{cases} \quad (2)$$



осмотическое давление проникающего через плазматическую мембрану вещества вне и внутри клетки соответственно; π_2^{out} и π_2^{in} – суммарное осмотическое давление непроникающего через плазматическую мембрану вещества вне и внутри клетки соответственно; Δ_p – перепад гидростатического давления на клеточной мембране; K_1 и σ_1 – коэффициенты проницаемости и отражения плазматической мембраны для проникающего через мембрану вещества соответственно; π_{20}^{in} и V_0 – начальные значения суммарного осмотического давления непроникающих веществ внутри клетки и ее начальный объем соответственно; α – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ (для МСК $\alpha = 0,367$).

Переход к безразмерным величинам приводит уравнения (1) к виду:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[\sigma_1 (\pi_1^{in} - \pi_1^{out}) + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - 1 \right] \\ \frac{d\pi_1^{out}}{dt} = -\frac{1}{\tau_1} \left[(\pi_1^{in} - \pi_1^{out}) + \sigma_1 \pi_1^{in} \frac{dy}{dt} \right] \frac{1}{y-\alpha} \\ \pi_2^{in} = \pi_2^{in}(0) \left(\frac{1-\alpha}{y-\alpha} \right) \end{cases} \quad (2)$$

где $y = \frac{V}{V_0}$; $\tau_0 = \frac{1}{L_p \gamma \hat{\pi}_0^{in}}$; $\tau_1 = \frac{1}{K_i \gamma}$; $\pi_0^{in} = 7,8$ атм – осмотическое давление изотонического раствора, $\pi_{1,2}^{in,out} = \pi_{1,2}^{in,out} / \pi_{20}^{in}$ – приведенное осмотическое давление проникающего (1) и непроникающего (2) компонентов внутри и вне клетки; γ – поверхностно-объемное отношение клетки.

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

где d – начальный диаметр клетки, измеряемый экспериментально. Коэффициент отражения клеточной мембраны σ_1 во всех расчетах принимали равным 0,95. Расчет коэффициентов проницаемости мембран клеток производили, решая дифференциальные уравнения (2). Варьируя параметры τ_0 и τ_1 определяли значения L_p и K_1 , добиваясь совпадения теоретических кривых с экспериментальными данными.

Используемая нами физико-математическая модель достаточно корректно описывает и осмотическое поведение клеток на этапе замораживания. Решениями модели при известных значениях L_p и K_1 являются зависимости $y(T)$, $\pi_1^{in}(T)$ и $\pi_2^{in}(T)$ от температуры. Такие решения несложно получить для линейных режимов охлаждения.

where $y = \frac{V}{V_0}$; $\tau_0 = \frac{1}{L_p \gamma \hat{\pi}_0^{in}}$; $\tau_1 = \frac{1}{K_i \gamma}$; $\pi_0^{in} = 7,8$ atm – osmotic pressure of isotonic solution; $\pi_{1,2}^{in,out} = \pi_{1,2}^{in,out} / \pi_{20}^{in}$ – normalized osmotic pressure of penetrating (1) and non-penetrating (2) components inside and outside the cell; γ – surface-volume ratio of a cell.

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

where d – initial diameter of a cell, measured experimentally. The reflection coefficient of cell membrane σ_1 was assumed as 0.95 for all the calculations. The coefficients of cell membrane permeability were calculated by solving the differential equations (2). Varying the parameters τ_0 and τ_1 allowed to determine the values L_p and K_1 by fitting the theoretical curves and experimental data.

The used by us mathematical model describes quite correctly an osmotic behavior of cells at the stage of freezing as well. At certain L_p and K_1 values the following dependences vs. temperature could be retrieved: $y(T)$, $\pi_1^{in}(T)$. The solutions are easy to obtain for the linear cooling protocols.

Change in the coefficients of filtration and permeability of plasma membrane to the soluted substances follows the Arrhenius' equations:

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[\frac{E_{a_0}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right],$$

$$K(T) = K(T_0) \exp \left[\frac{E_{a_1}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right],$$

where T_0 – initial temperature of cell suspension, K; E_{a_0} and E_{a_1} – activation energies of transfer through the plasma membrane of water molecules and a solute, respectively; R_0 – universal gas constant (8.314 kJ/mol·grad).

The cell osmotic behavior during freezing with various cooling rates was predicted by means of substituting the determined values L_p and K_1 in the model equations. The means were assumed in respect of the published data for different cell types E_{a_0} (20–40 kJ/mol), E_{a_1} (60–90 kJ/mol) [4, 28, 25].

The transition to the new variables was as follows:

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

where β – cooling rate.

The system of differential equations describing the kinetics of changes in the relative volume and concentration of cells penetrating through the plasma membrane substance inside a cell during extracellular crystallization was as follows:



Изменение коэффициентов фильтрации и проницаемости плазматической мембраны для растворенного вещества подчиняется аррениусовым зависимостям:

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[\frac{E_{a_0}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right],$$

$$K(T) = K(T_0) \exp \left[\frac{E_{a_1}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right],$$

где T_0 – исходная температура клеточной суспензии, K ; E_{a_0} и E_{a_1} – энергии активации процесса переноса через плазматическую мембрану молекул воды и растворенного вещества соответственно; R_0 – универсальная газовая постоянная (8,314 кДж/моль·град).

Прогнозирование осмотического поведения клеток при замораживании с разными скоростями осуществляли, подставляя в уравнения модели найденные значения L_p и K . Исходя из литературных данных для разных типов клеток принимали средние значения E_{a_0} (20–40 кДж/моль), E_{a_1} (60–90 кДж/моль) [7, 10, 25].

Переход к новым переменным производился следующим образом:

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

где β – скорость охлаждения.

Система дифференциальных уравнений, описывающая кинетику изменения относительного объема клетки и концентрацию проникающего через плазматическую мембрану вещества внутрь клетки в процессе внклеточной кристаллизации, имеет вид:

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{dy}{dT} &= p \exp \left(a \frac{(T-1)}{T} \right) \left\{ \left[\sigma_1 \pi_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \right. \right. \\ &\left. \left. \left[1 + \sigma_1 \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \pi_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \pi_2^{out} \right\} \right. \\ \frac{d\pi_1^{in}}{dT} &= \frac{p}{y-\alpha} \left\{ \left[\sigma_1 \pi_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - (1 + \sigma_1 \Phi_{out}) \pi_2^{out} \right] \times [(1-\sigma_1) \pi_{1\infty} - \pi_1^{in}] \times \right. \\ &\left. \times \exp \left(a \frac{(T-1)}{T} \right) - q (\pi_1^{in} - \Phi_{out} \pi_2^{out}) \exp \left(b \frac{(T-1)}{T} \right) \right\} \end{aligned} \right\}, \quad (3)$$

где

$$\Phi_{out} = \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \pi_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0},$$

$$\pi_2^{out} = \frac{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}{1 - y g_0 - x(1-\alpha g_0)},$$

здесь $p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}$, $q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}$, $a \equiv \frac{E_{a_0}}{R_0 T_0}$, $b \equiv \frac{E_{a_1}}{R_0 T_0}$,

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{dy}{dT} &= p \exp \left(a \frac{(T-1)}{T} \right) \left\{ \left[\sigma_1 \pi_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \right. \right. \\ &\left. \left. \left[1 + \sigma_1 \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \pi_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \pi_2^{out} \right\} \right. \\ \frac{d\pi_1^{in}}{dT} &= \frac{p}{y-\alpha} \left\{ \left[\sigma_1 \pi_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - (1 + \sigma_1 \Phi_{out}) \pi_2^{out} \right] \times [(1-\sigma_1) \pi_{1\infty} - \pi_1^{in}] \times \right. \\ &\left. \times \exp \left(a \frac{(T-1)}{T} \right) - q (\pi_1^{in} - \Phi_{out} \pi_2^{out}) \exp \left(b \frac{(T-1)}{T} \right) \right\} \end{aligned} \right\}, \quad (3)$$

where

$$\Phi_{out} = \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \pi_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0},$$

$$\pi_2^{out} = \frac{\pi_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}{1 - y g_0 - x(1-\alpha g_0)},$$

here $p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}$, $q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}$, $a \equiv \frac{E_{a_0}}{R_0 T_0}$, $b \equiv \frac{E_{a_1}}{R_0 T_0}$, g_0 – initial value of the ratio of the total cell volume to the total volume of the system.

In our calculations the kinetics of change in the concentration (C) of extracellular solution during freezing was analytically set by the approximation [26] of phase diagram of DMSO aqueous solution melting as follows:

$$C = -0.00055T^3 - 0.06348T^2 - 2.78524T;$$

where T was the current temperature.

From the system of equations (3) we obtained the dependences of cell volume vs. freezing temperature for certain transport features of cells and chosen cooling rates. Taking into account the dehydration rate either possibility or impossibility of intracellular crystallization in MSCs at the considered cooling protocol could be assumed.

As the cryoprotective medium we have used α -MEM with 10% FBS and 1 M DMSO (final concentration). The medium with double concentration of DMSO and FBS was slowly dropwise added to an equal volume of culture medium containing either suspended or AMS encapsulated MSCs. The samples were incubated for 15 min at 4°C and frozen in cryovials (Nunc, USA), 1 ml (1×10^5 cells/ml). Cooling of the samples was performed using a programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine) at a cooling rate of 0.5; 1; 10 and 20 deg/min down to –40°C, followed by plunging them into liquid nitrogen (–196°C).

After storage for 1–2 days the samples were thawed in a water bath at 37°C and the cryoprotectant was removed by slow dilution of frozen-thawed suspension by α -MEM with 10% FBS in 1:10 ratio.



g_0 – начальное значение отношения суммарного объема клеток к полному объему системы.

Кинетику изменения концентрации (C) внеклеточного раствора в процессе замораживания при расчетах задавали аналитически путем аппроксимации [8] фазовой диаграммы плавления водного раствора для ДМСО в следующем виде:

$$C = -0,00055T^3 - 0,06348T^2 - 2,78524T;$$

где T – текущая температура.

Из системы уравнений (3) для определенных транспортных характеристик клеток и выбранных скоростей охлаждения получали зависимости объема клеток от температуры замораживания. Учитывая степень дегидратации, можно предположить о возможности или невозможности внутриклеточной кристаллизации в МСК при данном режиме охлаждения.

В качестве криозащитной среды использовали среду α -MEM, содержащую 10% ЭС и ДМСО в конечной концентрации 1 М. Среду с двойной концентрацией ДМСО и ЭС медленно по каплям добавляли в равный объем культуральной среды, содержащей суспензию или заключенные в АМС МСК. Образцы эквilibрировали в течение 15 мин при температуре 4°C и замораживали в криопробирках («Nunc», США) объемом 1 мл (1×10^5 кл/мл). Охлаждение образцов проводили с помощью программного замораживателя «УОП-6» (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) при скоростях охлаждения 0,5; 1; 10 и 20 град/мин до достижения температуры -40°C, с последующим их погружением в жидкий азот (-196°C).

После хранения в течение 1–2-х суток, образцы отогревали на водяной бане при 37°C и удаляли криопротектор путем медленного разведения деконсервированной суспензии средой α -MEM с 10% ЭС в соотношении 1:10. Суспензию клеток центрифугировали при 150g в течение 7 мин, к осадку добавляли свежую среду α -MEM с ЭС и определяли жизнеспособность клеток.

Жизнеспособность МСК оценивали с помощью МТТ-теста [26]. Для этого к 1 мл суспензии клеток добавляли 100 мкл редокс-индикатора МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия) бромида («Sigma-Aldrich») в концентрации 5 мг/мл. После 2 ч инкубации при температуре 37°C образцы центрифугировали, осадок суспендировали в физиологическом растворе и подсчитывали количество клеток в камере Горяева согласно стандартной методике [27]. Жизнеспособность определяли как отношение количества МСК, накопивших формазан, к общему количеству клеток и выражали в процентах.

The cell suspension was centrifuged at 150g for 7 min, the fresh α -MEM with FBS was added to the sediment and the cell viability was examined.

Viability of MSCs was assessed using MTT assay [21]. With this aim 100 ml redox indicator MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium)bromide (Sigma-Aldrich) at a concentration of 5 mg/ml was added to 1 ml cell suspension. After 2 hrs of incubation at 37°C the samples were centrifuged, the pellet was re-suspended in physiological saline and the number of cells was counted in a Goryaev's chamber according to the standard procedures [23]. Viability was defined as the ratio of the number of MSCs, which accumulated formazan, to the total number of cells and was expressed as a percentage.

The results were statistically processed using the Excel software (Microsoft, USA) and Past Statistic v/3/01 (Sweden). Depending on the nature of the distribution of a data set, significance of the differences between the indices was assessed using a parametric Student's t-test or nonparametric Mann-Whitney test. The differences between the samples were considered as significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

We have carried out a series of experiments to investigate the osmotic reaction of MSCs either suspended or encapsulated in AMS occurred during the contact with 1M DMSO solution at 22°C. Figure 1 shows the experimental data and theoretical curves representing the kinetics of cell volume changes during of their contact with the cryoprotectant solution.

Calculations using mathematical model allowed to fit theoretical curve and the experimental data if the coefficients of permeability of MSCs membranes for water molecules (L_p) and DMSO (K_1) were in suspension: $L_p = (3.38 \pm 1.1) \times 10^{-14}$ m³/N·sec; $K_1 = (1.60 \pm 0.21) \times 10^{-8}$ m/sec; and in AMS: $L_p = (2.03 \pm 1.4) \times 10^{-14}$ m³/N·sec; $K_1 = (1.07 \pm 0.18) \times 10^{-8}$ m/sec.

Thus, the rate of water and DMSO penetration through membranes of the MSCs encapsulated in AMS was lower than that of the membranes in suspended cells.

Using the obtained permeability coefficients and the mathematical model, describing the kinetics of changes in relative volume of MSCs during extracellular crystallization of a suspension, we have predicted the rate of cell dehydration, depending on the cooling rate of MSCs suspension and cells, encapsulated in AMS (Fig. 2). Figure 2 shows that the predicted dehydration of cells which were cooled with the rates from 0.5 to 20 deg/min down to -40°C was different. Thus, at a cooling rate of 0.5 deg/min the calculated relative volume of MSCs in suspension was 0.49 and in AMS it was 0.57; at 1 deg/min these were 0.62 and 0.74, respectively. Cooling with higher rates resulted in the



Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программ «Excel» («Microsoft», США) и «Past Statistic v/3/01» (Швеция). В зависимости от характера распределения данных, значимость различий между показателями оценивали, используя параметрический t-критерий Стьюдента или непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия между выборками считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Нами была проведена серия экспериментов по исследованию осмотической реакции МСК, находящихся в суспензии и в составе АМС, с 1 М раствором ДМСО при температуре 22°C. На рис. 1 представлены полученные экспериментальные данные и теоретические кривые кинетики изменения клеточного объема от времени их нахождения в растворе криопротектора.

Расчет с использованием физико-математической модели показывает, что теоретическая кривая корректно описывает экспериментальные данные при коэффициентах проницаемости мембран МСК для молекул воды (L_p) и ДМСО (K_1) в суспензии – $L_p = (3,38 \pm 1,1) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$; $K_1 = (1,60 \pm 0,21) \times 10^{-8} \text{ м/с}$; в АМС – $L_p = (2,03 \pm 1,4) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$; $K_1 = (1,07 \pm 0,18) \times 10^{-8} \text{ м/с}$.

Следовательно, скорость проникновения воды и ДМСО через мембраны МСК, которые заключены в АМС меньше, чем через мембраны клеток в суспензии.

Подставляя полученные коэффициенты проницаемости в физико-математическую модель, которая описывает кинетику изменения относительного объема МСК в процессе внеклеточной кристаллизации суспензии, мы спрогнозировали степень обезвоживания клеток в зависимости от скорости охлаждения суспензии МСК и клеток, заключенных в АМС (рис. 2). Из рис. 2. видно, что прогнозируемое обезвоживание клеток, которые замораживали со скоростями от 0,5 до 20 град/мин при –40°C, было разным. Так, при скорости охлаждения 0,5 град/мин рассчитанный относительный объем МСК в суспензии равнялся 0,49, а в АМС – 0,57; при 1 град/мин – 0,62 и 0,74 соответственно. В то время как при высоких скоростях охлаждения относительный объем клеток достигал 0,96 (МСК в суспензии, скорость охлаждения от 10 град/мин) и 0,99 (МСК в АМС скорость охлаждения от 20 град/мин).

Исходя из прогноза нами были проведены эксперименты по замораживанию МСК в суспензии и АМС в криозащитной среде при разных скоростях охлаждения (0,5, 1, 10 и 20 град/мин). Быстрое охлаждение образцов со скоростью 10 и

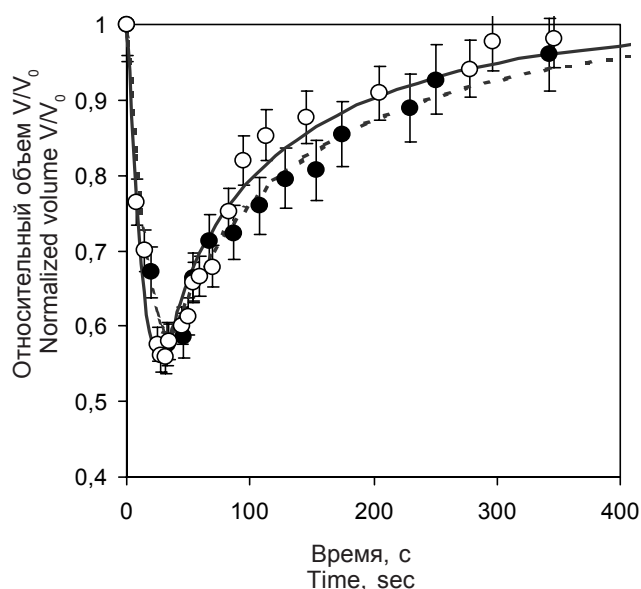


Рис. 1. Осмотическая реакция МСК на контакт с 1 М раствором ДМСО; ○● – экспериментальные значения; — — — — — теоретические кривые; ○ — — — — — МСК на стекле; ● — — — — — МСК в альгинатных сферах.

Fig. 1. Osmotic reaction of MSCs during contact with 1 M DMSO solution; ○● – experimental data; — — — — — theoretical data; ○ — — — — — MSCs on glass, ● — — — — — MSCs on alginate microspheres.

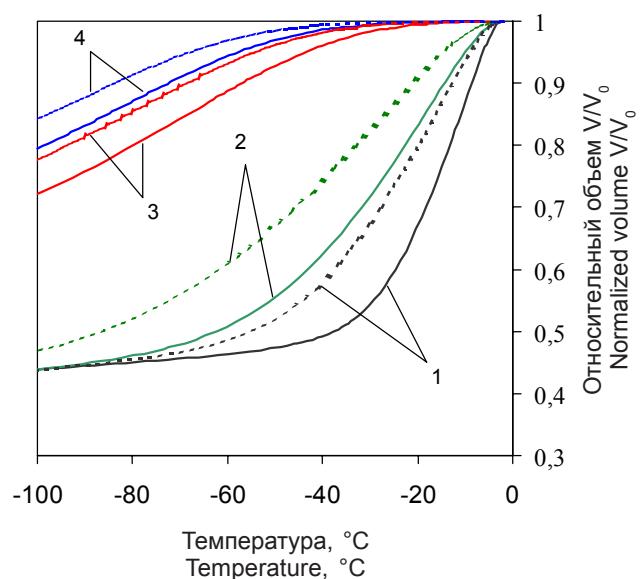


Рис. 2. Прогнозируемая кинетика изменения объема МСК в суспензии (сплошная линия) и в составе АМС (штриховая линия) при скоростях охлаждения 0,5 (1), 1 (2), 10 (3) и 20 (4) °С/мин.

Fig. 2. Predicted kinetics of MSCs volume change in suspension (solid line) and as components of AMS (dotted line) at various cooling rates: 0.5 (1), 1 (2), 10 (3) and 20 (4) °C/min.



20 град/мин приводило к гибели ~80% клеток, находящихся как в виде суспензии, так и в составе АМС (рис. 3). Следует отметить, что если при скорости охлаждения 20 град/мин жизнеспособность МСК в суспензии и в АМС не отличалась, то при 10 град/мин жизнеспособность клеток в составе АМС была несколько выше, чем в суспензии. Возможно, это связано с защитным действием альгинатного гидрогеля, которое проявляется при данной скорости охлаждения.

При использовании высоких скоростей охлаждения отмечалось нарушение целостности АМС и наличие в деинкапсулированных образцах фрагментов разрушенного альгинатного гидрогеля и структурных компонентов клеток. Гибель большей части клеток при высоких скоростях охлаждения, вероятно, объясняется формированием внутриклеточных кристаллов льда за счет уменьшения времени дегидратации клеток.

После криоконсервирования, включающего низкие скорости охлаждения 0,5 и 1 град/мин, не было выявлено нарушений целостности АМС, а жизнеспособность клеток составляла не менее 75%. Максимальные значения жизнеспособности ((88 ± 4)%) были получены после криоконсервирования МСК в суспензии со скоростью охлаждения 1 град/мин. Жизнеспособность клеток после криоконсервирования по этой программе в составе АМС была несколько ниже и составляла (81 ± 4)%. Следует отметить, что подобные результаты ранее были нами получены при криоконсервировании МСК в суспензии и АМС большего размера (500–1000 мкм) [6]. В проведенных экспериментах нам удалось повысить жизнеспособность МСК в АМС до уровня суспензии с помощью инициации кристаллообразования. В настоящем исследовании одинаковые значения жизнеспособности МСК в суспензии и в составе АМС были получены при снижении скорости охлаждения до 0,5 град/мин. Эти данные свидетельствуют о том, что альгинатный гидрогель замедляет дегидратацию и ограничивает перенос ДМСО в клетку. Наиболее простым и доступным способом преодоления этого ограничения является снижение скорости охлаждения образца. Тот факт, что после криоконсервирования с применением скорости охлаждения 0,5 град/мин жизнеспособность была несколько ниже максимальных значений, полученных при охлаждении суспензии со скоростью 1 град/мин, объясняется, очевидно, токсическим действием ДМСО, которое проявляется при его длительной экспозиции с клетками.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что криоконсервирование МСК в составе АМС под защитой 1 М ДМСО с использованием низких скоростей охлаждения позволяет

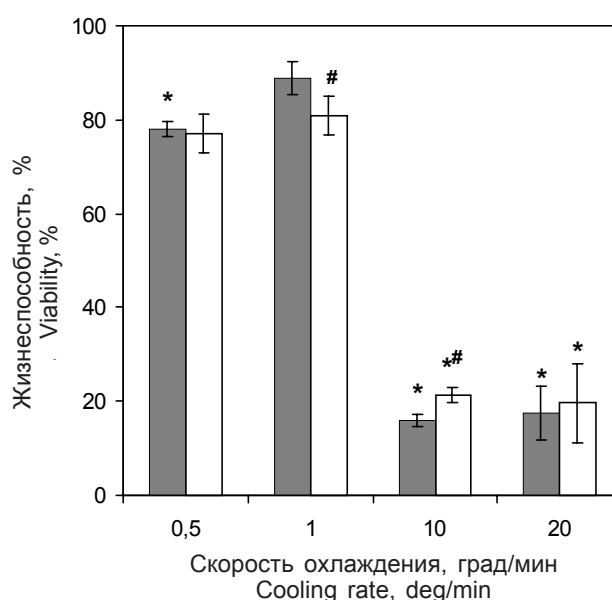


Рис. 3. Жизнеспособность МСК в суспензии (■) и заключенных в АМС (□) после криоконсервирования в присутствии 1 М ДМСО при различных скоростях охлаждения. Различия значимы по отношению к 1 град/мин (*) и к суспензии МСК (#), $p < 0,05$.

Fig. 3. Viability of suspended (■) and encapsulated (□) MSCs after cryopreservation with 1 M DMSO at various cooling rates. Differences are significant comparing with data for 1 deg/min (*) and suspended MSCs (#), $p < 0.05$.

relative cell volume of 0.96 (MSCs in suspension, cooling rate of 10 deg/min) and 0.99 (MSCs in AMS, cooling rate of 20 deg/min).

To test the outcome of simulations we have performed the experiments on freezing of suspended and encapsulated MSCs in cryoprotective medium with different cooling rates (0.5, 1, 10 and 20 deg/min). Rapid cooling of samples with the rates of 10 and 20 deg/min resulted in a death of almost 80% cells either suspended or encapsulated in AMS (Fig. 3). It should be noted, that MSCs viability in suspension and in AMS did not differ if cooling rate of 20 deg/min was used, while at 10 deg/min the viability of encapsulated cells was slightly higher than in suspended ones. This was likely due to a protective effect of alginate hydrogel manifested at the given cooling rate.

After using high cooling rates we observed the partial disintegration of AMS and presence of the fragments of destroyed alginate hydrogel and structural components of cells in de-encapsulated samples. The death of most cells at high cooling rates was probably caused by the formation of intracellular ice crystals because of the reduced time of cell dehydration.

After cryopreservation using low cooling rates of 0.5 and 1 deg/min we have not found any disintegrated AMS and cell viability made as much as 75%. Maxi-

добиться высоких показателей жизнеспособности, сопоставимых с результатами, полученными ранее [6]. Проведенные исследования являются основой для создания низкотемпературных банков МСК, заключенных в альгинатные микросферы, для дальнейшего использования в различных областях регенеративной медицины.

Выводы

1. Замораживание МСК до -40°C в присутствии 1 М ДМСО со скоростями охлаждения 0,5 и 1 град/мин обеспечивает достаточную их дегидратацию для предотвращения повреждений, связанных с внутриклеточной кристаллизацией.

2. Осмотическая реакция МСК в составе АМС замедлена по сравнению с клетками в суспензии, коэффициенты проницаемости составляют соответственно $L_p = (2,03 \pm 1,4) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$; $K_1 = (1,07 \pm 0,18) \times 10^{-8} \text{ м/с}$ и $L_p = (3,38 \pm 1,1) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$; $K_1 = (1,60 \pm 0,21) \times 10^{-8} \text{ м/с}$.

3. Теоретический расчет и экспериментальные исследования показали, что криоконсервирование со скоростями охлаждения 0,5 и 1 град/мин позволяет снизить влияние АМС на степень дегидратации МСК и добиться высоких показателей их жизнеспособности.

Литература

1. Безуглый Н.Д., Осташко Ф.И., Волкова Е.Г. и др. Волюмометрия как метод изучения проницаемости мембранного аппарата яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих // Научн.-техн. бюл. НИИ животновод. Лесостепья и Полесья УССР. – 1986. – №43. – С. 29–35.
2. Волкова Н.А., Мазур С.П., Холодный В.С. и др. Стволовые клетки кожи как объект криоконсервирования. 1. Стволовой резерв кожи // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №1. – С. 3–15.
3. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наукова думка. – 1994. – 142 с.
4. Петренко А.Ю., Мазур С.П., Петренко Ю.А. и др. Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // Трансплантология. – 2007. – Т.9, №1. – С. 218–220.
5. Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г., Волкова Н.А. и др. Характеристика иммунофенотипа и дифференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №4. – С. 436–442.
6. Правдюк А.И., Петренко Ю.А., Холодный В.С. и др. Изучение криочувствительности мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 235–245.
7. Тарасов А.И., Петренко А.Ю., Джонс Д.Р.Е. Осмотические характеристики кровяных клеток-предшественников эмбриональной печени человека // Біофіз. Вісник, Вісн. Харк. ун-ту. – 2002. – Вип. 2(11), №568. – С. 57–61.

imum viability values ($(88 \pm 4)\%$) were obtained after cryopreservation of MSCs in a suspension at a cooling rate of 1 deg/min. Viability of the encapsulated MSCs after cryopreservation according to this protocol was slightly lower ($(81 \pm 4)\%$). It should be noted that similar results were previously obtained by us when the MSCs were cryopreserved both in a suspension and AMS of larger size ($500\text{--}1,000 \mu\text{m}$) [6]. In the present research we succeeded to improve the viability of MSCs in AMS up to the level observed in the suspended cells if ice seeding was used. For example, the same values of MSCs viability in suspension and in AMS were obtained if cooling rate was decreased down to 0.5 deg/min. These data indicate that the alginate hydrogel slowed down the dehydration and limited the transfer of DMSO into a cell. The most simple and affordable way to overcome this limitation was to reduce the cooling rate of the sample. Cryopreservation using the cooling rate of 0.5 deg/min resulted in the viability which was slightly lower than the maximum values obtained when cooling a suspension with the rate of 1 deg/min, and this fact could be apparently explained by toxic effect of DMSO manifested during long-term cell incubation.

The results of this research indicated that cryopreservation of the encapsulated MSCs under 1 M DMSO protection using low cooling rates allowed to achieve high viability rates, which were similar to the values obtained previously [22]. The performed studies could be the basis for the establishment of low-temperature banks of the cells encapsulated into alginate microspheres to be used in various fields of regenerative medicine.

Conclusions

1. Cooling of MSCs down to -40°C in 1 M DMSO presence with the rates of 0.5 and 1 deg/min provides a sufficient dehydration to prevent their damage resulted from intracellular crystallization.

2. Osmotic reaction of MSCs encapsulated in AMS was delayed as compared with the cells in suspension, permeability coefficients were respectively $L_p = (2.03 \pm 1.4) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{N}\cdot\text{sec}$; $K_1 = (1.07 \pm 0.18) \times 10^{-8} \text{ м/с}$ and $L_p = (3.38 \pm 1.1) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{N}\cdot\text{sec}$; $K_1 = (1.60 \pm 0.21) \times 10^{-8} \text{ м/с}$.

3. Theoretical calculations and experimental studies have shown that cryopreservation at a cooling rate of 0.5 and 1 deg/min enabled to reduce the impact of AMS encapsulation on the dehydration rate of MSCs and achieve higher viability indices.

References

1. Bezugly N.D., Ostashko F.I., Volkova E.G. et al. Volumetry as a method for studying the permeability of the egg and mammalian embryos membrane. Nauchn.-Tekhn. Bull. NIIZH L and P of the Ukrainian SSR 1986; 34: 25–34.



8. Тодрин А.Ф., Попивненко Л.И., Коваленко С.Е. Теплофизические свойства криопротекторов. I. Температура и теплота плавления // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №2. – С. 163–176.
9. Труфанова Н.А., Петренко Ю.А., Петренко А.Ю. Влияние криоконсервирования на жизнеспособность, иммунофенотип и дифференцировочные свойства мезенхимальных стромальных клеток ранних стадий органогенеза // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №2. – С. 135–144.
10. Чернобай Н.А. Температурна залежність осмотичних реакцій клітин стероїд продукуючих тканин і СПСВ в розчинах криопротекторів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2012. – 20 с.
11. Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M. 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. – Vol. 36, №5. – P. 642–654.
12. Blandino A., Macias M., Cantero D. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics // *J. Biosci. Bioeng.* – 1999. – Vol. 88, №6. – P. 686–689.
13. Chang T.M. Semipermeable microcapsules // *Science.* – 2014. – Vol. 146, №3643. – P. 524–525.
14. Dandoy P., Meunier C.F., Leroux G. et al. A hybrid assembly by encapsulation of human cells within mineralised beads for cell therapy // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, №1. – P. 1–8.
15. de Vos P., Faas M.M., Strand B. et al. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27, №32. – P. 5603–5617.
16. Gharravi A.M., Orazizadeh M., Ansari-Asl K. et al. Design and fabrication of anatomical bioreactor systems containing alginate scaffolds for cartilage tissue engineering // *Avicenna J. Med. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 4, №2. – P. 65–74.
17. Gryshkov O., Pogozykh D., Hofmann N. et al. Encapsulating non-human primate multipotent stromal cells in alginate via high voltage for cell-based therapies and cryopreservation // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, №9. – P. 1–12.
18. Gryshkov O., Pogozykh D., Zernetsch H. et al. Process engineering of high voltage alginate encapsulation of mesenchymal stem cells // *Materials Science and Engineering C.* – 2014. – Vol. 36. – P. 77–83.
19. Hunt N.C., Shelton R.M., Grover L.M. Reversible mitotic and metabolic inhibition following the encapsulation of fibroblasts in alginate hydrogels // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30, №32. – P. 6435–6443.
20. Lim F., Sun A. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas // *Science.* – 1980. – Vol. 210, №4472. – P. 908–910.
21. Machluf M., Orsola A., Boorjian S. et al. Microencapsulation of Leydig cells: a system for testosterone supplementation // *Endocrinology.* – 2003. – Vol. 144, №11. – P. 4975–4979.
22. Morch Y.A., Donati I., Strand B.L. et al. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads // *Biomacromolecules.* – 2006. – Vol. 7, №5. – P. 1471–1480.
23. Moshaverinia A., Ansari S., Chen C. et al. Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem cells in alginate microspheres for bone tissue engineering // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34, №28. – P. 6572–6579.
24. Nolan J.S., Packer L. Monolayer culture techniques for normal human diploid fibroblasts // *Methods Enzymol.* – 1974. – Vol. 32, Pt B. – P. 561–568.
25. Paynter S.J., Fuller B.J., Shaw R.W. Temperature dependence of mature mouse oocyte membrane permeabilities in the presence of cryoprotectant // *Cryobiology.* – 1997. – Vol. 34, №2. – P. 122–130.
26. Petty R.D., Sutherland L.A., Hunter E. M., Cree I.A. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number // *J. Biolumin. Chemilumin.* – 1995. – Vol. 10, №1. – P. 29–34.
2. Blandino A., Macias M., Cantero D. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics. *J Biosci Bioeng.* 1999; 88(6): 686–689.
3. Chang T.M. Semipermeable microcapsules. *Science* 2014; 146(3643): 524–525.
4. Chernobai N.A., Pakhomov A.V., Kovalenko I.F. et al. Temperature dependence of testes interstium cell membrane permeability for cryoprotectant molecules. *Problems of Cryobiology* 2010; 20(2): 153–158.
5. Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M. 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): 642–654.
6. Dandoy P., Meunier C.F., Leroux G. et al. A hybrid assembly by encapsulation of human cells within mineralised beads for cell therapy. *PLoS One* 2013; 8(1): 1–8.
7. de Vos P., Faas M.M., Strand B. et al. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 2006; 27(32): 5603–5617.
8. Gharravi A.M., Orazizadeh M., Ansari-Asl K. et al. Design and fabrication of anatomical bioreactor systems containing alginate scaffolds for cartilage tissue engineering. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2012; 4(2): 65–74.
9. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cellular suspensions. Kiev: Nauk. Dumka 1994.
10. Gryshkov O., Pogozykh D., Hofmann N. et al. Encapsulating non-human primate multipotent stromal cells in alginate via high voltage for cell-based therapies and cryopreservation. *PLoS One* 2014; 9(9): 1–12.
11. Gryshkov O., Pogozykh D., Zernetsch H. et al. Process engineering of high voltage alginate encapsulation of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014; 36: 77–83.
12. Hunt N.C., Shelton R.M., Grover L.M. Reversible mitotic and meta-bolic inhibition following the encapsulation of fibroblasts in alginate hydrogels. *Biomaterials* 2009; 30(32): 6435–6443.
13. Lim F., Sun A. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210(4472): 908–910.
14. Machluf M., Orsola A., Boorjian S. et al. Microencapsulation of Leydig cells: a system for testosterone supplementation. *Endocrinology* 2003; 144(11): 4975–4979.
15. Morch Y.A., Donati I., Strand B.L. et al. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads. *Biomacromolecules* 2006; 7(5): 1471–1480.
16. Moshaverinia A., Ansari S., Chen C. et al. Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem cells in alginate microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2013; 34(28): 6572–6579.
17. Nolan J.S., Packer L. Monolayer culture techniques for normal human diploid fibroblasts. *Methods Enzymol.* 1974; 32: 561–568.
18. Paynter S.J., Fuller B.J., Shaw R.W. Temperature dependence of mature mouse oocyte membrane permeabilities in the presence of cryoprotectant. *Cryobiology* 1997; 34(2): 122–130.
19. Petrenko A.Yu., Mazur S.P., Petrenko Yu.A. et al. Isolation and multilineage differentiation of stromal cells from human fetal and adult tissue. *Transplantologiya* 2007; 9(1): 218–220.
20. Petrenko Yu.A., Skorobogatova N.G., Volkova N.A. et al. Characteristics of immunophenotype and differentiation potential of human mesenchymal bone marrow stromal cells after cryopreservation. *Problems of Cryobiology* 2010; 20(4): 436–442.
21. Petrenko Yu.A., Skorobogatova N.G., Volkova N.A. et al. Characteristics of immunophenotype and differentiation potential of human mesenchymal bone marrow stromal cells after cryopreservation. *Problems of Cryobiology* 2010; 20(4): 436–442.
22. Petty R.D., Sutherland L.A., Hunter E.M. et al. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin.* 1995; 10(1): 29–34.

27. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell. Biol.* – 1976. – Vol. 13. – P. 29–43.
28. Sun J., Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications // *Materials*. – 2013. – Vol. 6, №4. – P. 1285–1309.
29. Velings N.M., Mestdagh M.M. Physico-chemical properties of alginate gel beads // *Polym. Gels Networks*. – 1995. – Vol. 3, №3. – P. 311–330.
23. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell. Biol.* 1976; 13: 29–43.
24. Sun J., Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials* 2013; 6(4): 1285–1309.
25. Tarasov A.I., Petrenko A.Yu., Jones D.R.E. Osmotic characteristics of hematopoietic progenitor cells of human embryonic liver. *Bulletin of Kharkiv National University No. 568: Biofizychnyy Visnyk* 2002; 11(2): 58–62.
26. Todrin A.F., Popivnenko L.I., Kovalenko S.Ye. Thermophysical properties of cryoprotectants. I. Temperature and heat of melting. *Problems of Cryobiology* 2009; 19(2): 163–176.
27. Trufanova N.A., Petrenko Yu.A., Petrenko A.Yu. Effect of cryopreservation on viability, immunophenotype and differentiation properties of mesenchymal stromal cells of early organogenetic stage. *Problems of Cryobiology* 2010; 20(2): 135–144.
28. Velings N.M., Mestdagh M.M. Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polym Gels Networks* 1995; 3(3): 311–330.
29. Volkova N.A., Mazur S.P., Kholodnyy V.S. et al. Skin stem cells as an object for cryopreservation. 1. Skin stem reserve. *Probl Cryobiol Cryomed* 2014; 24(1): 3–15.

