



<https://doi.org/10.15407/cryo35.02.103>

УДК 547.458.233.32:611.018.013.395:57.086.13:[544.77.022.822:547.962.9

Н.А. Труфанова *, О.Ю. Рогульська, О.А. Семенченко, О.С. Міщенко, О.Ю. Петренко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
м. Харків, Україна

*n.a.trufan@gmail.com

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У СКЛАДІ МАКРОПОРИСТИХ МАТРИЦЬ ПІСЛЯ ПЕРЕДОБРОБКИ САХАРОЗОЮ

Мезенхімальні стромальні/стовбурові клітини (МСК) привертають увагу науковців та спеціалістів різних галузей медицини завдяки високому імунomodulatory та регенеративному потенціалу, здатності до мультилінійного диференціювання. Важливою умовою впровадження МСК у медичну та лабораторну практику є розробка ефективних технологій їхнього зберігання. Досліджено вплив попередньої обробки (передобробки) сахарозою на життєздатність, метаболічну активність та диференціовальний потенціал МСК після кріоконсервування у складі тривимірних (3D) макропористих матриць. Показано, що передобробка сахарозою підвищує ефективність кріоконсервування клітин у складі колагенових матриць шляхом повільного охолодження в присутності 10% ДМСО та сироватки. Життєздатність і метаболічна активність клітин після кріоконсервування у 3D матрицях була суттєво вище за умови передобробки сахарозою. Встановлено, що клітини після кріоконсервування зберігали здатність до проліферації та мультилінійного диференціювання. Доведено, що використання сахарози для передобробки клітин є перспективним підходом, який забезпечує зменшення кріопошкоджень під час кріоконсервування клітин у складі 3D матриць і відкриває нові можливості для підвищення ефективності зберігання тканинно-інженерних конструкцій.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, попередня обробка, сахароза, кріоконсервування, диметилсульфоксид, життєздатність, метаболічна активність, індуковане диференціювання, тканинно-інженерні конструкції.

Культивування мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин (МСК) у складі тривимірних (3D) матриць дозволяє досліджувати біологічні властивості клітин в умовах, максимально наближених до природних. Для створення клітинних носіїв розроблено цілу низку різноманітних методів: висолювання, ліофілізація, кріогелювання, електроспінінг і 3D принтинг. Ще більш різноманітними є варіанти вибору полімеру, з якого буде складатися матриця: полімолочна і полігліколієва кислоти,

альгінат, хітозан, колаген, желатин та їх композиції [2]. В даній роботі дослідження проводили з використанням полімерних кріогелів на основі колагену. Вибір колагенового носія був обумовлений, в першу чергу, високою біосумісністю, нетоксичністю та низькою імуногенністю матеріалу [8, 12]. В якості джерела МСК були обрані біоптати шкіри. Отримані з цього джерела МСК знайшли широке застосування в тканинній інженерії і регенеративній медицині [19].

Цитування: Труфанова НА, Рогульська ОЮ, Семенченко ОА, Міщенко ОС, Петренко ОЮ. Кріоконсервування мезенхімальних стовбурових клітин у складі макропористих матриць після передобробки сахарозою. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(2):105–112. <https://doi.org/10.15407/cryo35.02.103>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Кріоконсервування і створення низькотемпературних банків дозволяє не тільки зберігати зразки протягом тривалого часу і використовувати майже одразу при виникненні потреби, а й забезпечує отримання сертифікованого і стандартизованого біологічного матеріалу. На відміну від достатньо ефективних і простих методів, запропонованих для заморожування суспензій клітин, розробка методів кріоконсервування клітин у складі 3D конструкцій залишається однією з найбільш актуальних проблем кріобіології. Відомо, що найбільш виражений пошкоджувальний вплив на розпластані клітини чинять осмотичні та механічні ефекти, спричинені формуванням кристалів льоду [4, 20].

На сьогодні для кріоконсервування клітин різного походження розроблено методичні підходи, які відрізняються за складом кріозахисного розчину, швидкостями і етапами заморожування. Проте «золотим» стандартом для кріоконсервування МСК вважається метод повільного двоетапного заморожування під захистом проникного кріопротектора ДМСО та ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби [10]. У зв'язку з цим для кріоконсервування суспензії МСК та клітин, культивованих у складі колагенових матриць, обрали саме цей варіант як вихідний. Раніше ми показали [17], що включення сахаридів (лактози, трегалози, сахарози, маніту чи рафінози) до середовища культивування за 24 години до процедури кріоконсервування, яке не містило кріопротектора, значно підвищувало життєздатність МСК шкіри людини, тобто було продемонстровано ефективність передобробки сахаридами для посилення стійкості МСК до дії низьких температур. Найвищі і майже однакові показники життєздатності клітин отримали при використанні сахарози, трегалози та рафінози. З огляду на цей факт в дослідженні використовували сахарозу як більш доступний та розповсюджений сахарид.

Метою даної роботи було дослідження впливу передобробки сахарозою на показники збереженості клітин у складі 3D конструкцій після кріоконсервування методом двоетапного повільного заморожування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В експериментах використовували культури МСК людини, які отримували методом О. Ро-

gul'ska та співавт. [18] з біопатів шкіри. Клітини були заготовлені з дотриманням норм біомедичної етики і зберігались у кріобанку Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України, м. Харків). Процедури отримання зразків тканин проводили після одержання письмової згоди проінформованих донорів згідно з рекомендаціями Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації з проведення біомедичних досліджень та вимогами Комітету з біоетики ІПКіК НАН України.

Моношарове культивування мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин. Культивування клітин проводили при 37 °С, 95 % вологості і 5 % CO₂ в середовищі експансії, яке складалося з α-МЕМ, доповненого 2 мМ L-глутаміну, 50 мкг/мл стрептоміцину та 50 од/мл пеніциліну, та додатково містило 10 % ЕС (усі препарати Biowest, Франція).

Після досягнення клітинними культурами 70%-го моношару їх трипсинізували за стандартною методикою і здійснювали подальший розсів із коефіцієнтом 1 : 3. Для експериментів використовували клітини 4—7 пасажів.

Тривимірне культивування мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин у складі колагенових носіїв. Для 3D культивування були використані полімерні макропористі носії на основі колагену, виготовлені методом, описаним нами раніше [18].

Для заселення носіїв клітинами у вигляді дисків діаметром 4 мм і товщиною 2 мм використовували перфузійний метод [15]. Отримані конструкції, які містили 200—300 тисяч клітин, переносили в лунки планшетів (SPL, Корея) та культивували в стандартних умовах у середовищі α-МЕМ з 10 % ЕС. Повну заміну середовища культивування проводили кожні 3—4 доби.

Кріоконсервування мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин у суспензії і складі колагенових матриць. Для кріоконсервування застосовували кріопротектор ДМСО у кінцевій концентрації 10 %. Кріозахисне середовище — середовище α-МЕМ із 10 % ЕС, що містило подвійну концентрацію ДМСО, повільно по краплям добавляли до рівного об'єму культурального середовища з клітинами. Експозицію клітин у кріозахисному середовищі проводили при 4 °С впродовж 15 хв. Клітини заморожували у кріоконтейнерах (SPL) об'ємом 1 мл за режи-

мом двоетапного повільного заморожування. Кріоконсервовані зразки зберігали у рідкому азоті щонайменше 2 тижні до відігріву і аналізу.

Передобробку здійснювали шляхом культивування клітин протягом 24 годин з сахарозою в кінцевій концентрації 100 мМ. У цьому випадку до складу кріозахисного розчину, окрім 10 % ДМСО і сироватки, вносили ще 200 мМ сахарози.

Відігрів виконували на водяній бані при 37 °С. Кріозахисне середовище видаляли шляхом десятиразового розведення середовища кріоконсервування розчином Хенкса (Biowest).

Аналіз життєздатності і метаболічної активності мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин. Життєздатність клітин на різних етапах дослідження визначали за допомогою комбінованого забарвлення етидіум бромідом (ЕБ) і флуоресцеїн діацетатом (ФДА) [8]. Включення флуоресцентних барвників до клітин оцінювали за допомогою інвертованого конфокального лазерного скануючого мікроскопа «Zeiss LSM 510 META» (Carl Zeiss, Німеччина) та програмного забезпечення «LSM 510 v. 4.2» (Carl Zeiss). Конфокальні зображення отримували вздовж осі Z з інтервалом 15 мкм при довжині хвилі збудження 488 нм для ФДА та 543 нм для ЕБ. Показник життєздатності визначали як відсоток флуоресцеїн-позитивних (зелених) клітин від загальної кількості забарвлених клітин, підрахунок для кожного зразка проводили в серії зображень, отриманих від поверхні до 150—210 мкм глибини носія.

Для оцінки метаболічної активності клітин в умовах дво- і тривимірного культивування використовували редокс-індикатор AlamarBlue (AB, Serotec, США) [14]. Вміст відновленої форми АВ визначали флуориметрично через 3 години культивування в середовищі експансії, яке містило 10% АВ, на спектрофлуориметрі «Tecan GENios» (Tecan Inc., Австрія) при хвилях збудження 550 нм та емісії 590 нм. Фоном було середовище з індикатором без клітин. Обробку даних проводили за допомогою програми «XFLUOR v. 4.50» (Tecan Inc.). Результати представляли в умовних одиницях флуоресценції (УОФ), які розраховували як відношення між рівнем флуоресценції дослідної та холостої проби (без клітин).

Оцінка здатності мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин до спрямованого ос-

тео- і адипогенного диференціювання. Для визначення здатності стромальних клітин до спрямованого остеогенного диференціювання за умов моношарової культури їх переводили до живильного середовища α -МЕМ, що містило 10 % ЕС, L-глутамін, антибіотики та індуктори остеогенезу: 100 нМ дексаметазону, 10 мМ β -гліцерофосфату, 0,2 мМ 2-фосфату L-аскорбінової кислоти (всі індуктори виробництва Sigma-Aldrich, США) [5].

Для оцінки здатності стромальних клітин до спрямованого адипогенного диференціювання їх переводили до живильного середовища α -МЕМ, що містило 10 % ЕС, 0,2 мМ L-глутаміну й антибіотики, а також індуктори адипогенезу у кількості 0,5 мМ 3-ізобутил-1-метил-ксантину, 1 мкМ дексаметазону, 10 мкг/мл інсуліну, 100 мкМ індометацину (всі індуктори виробництва Sigma-Aldrich) [21].

Клітини культивували у середовищах індукції впродовж 21 доби, після чого культури фіксували впродовж 30 хв при 4 °С у 10%-вому формаліні, який готували на фосфатному буфері (рН 7,2). Здатність до остеогенного диференціювання оцінювали за експресією лужної фосфатази з використанням набору «Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit № 85» (Sigma-Aldrich) згідно з інструкцією виробника.

Індикацію накопичення ліпідів проводили шляхом забарвлення культур масляним червоним О [6].

Отримані в роботі експериментальні результати обробляли статистично. Оцінку нормальності розподілу отриманих результатів проводили за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Залежно від характеру розподілу даних для порівняння вибірок використовували t-критерій Стьюдента із поправкою Бонферроні або однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA і критерій Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Кріоконсервування МСК у вигляді суспензій після відігріву дозволяло отримати понад (89 \pm 4)% життєздатних клітин. На відміну від заморожування суспензії клітин, кріоконсервування МСК у складі матриць значно зменшувало відсоток життєздатних клітин. Показники, отримані за підрахунком кількісного співвідношення ФДА-позитивних (живих) клітин і

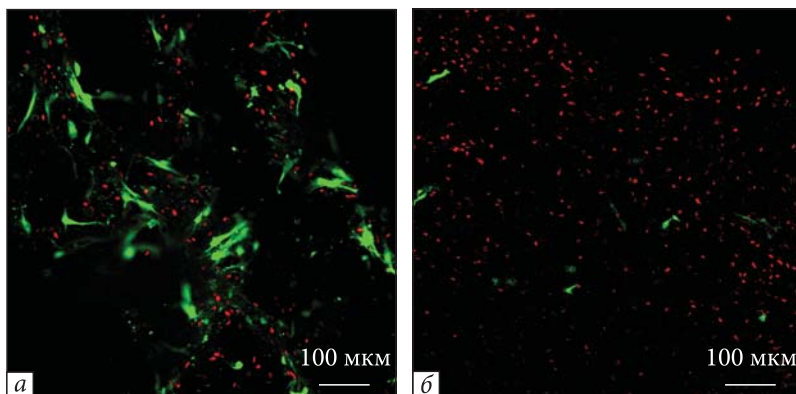


Рис. 1. МСК у складі колагенових матриць, кріоконсервованих під захистом 10 % ДМСО (а) і без застосування кріопротектора (б). Забарвлення ФДА/ЕБ, конфокальна лазерна мікроскопія

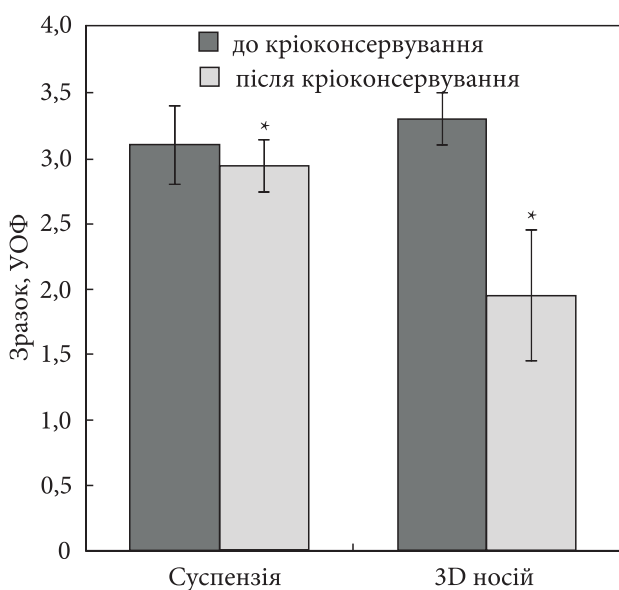


Рис. 2. Метаболічна активність МСК у складі тривимірних носіїв на основі колагену та у вигляді суспензії до (■) та після (□) кріоконсервування

ЕБ-позитивних (мертвих) клітин, складала $(48 \pm 4) \%$. Якісним негативним контролем були матриці з клітинами, які заморожували без використання кріопротекторів. Після такого варіанту заморожування на поверхні пор носія залишалися лише поодинокі життєздатні МСК. Характерні мікрофотографії клітин, кріоконсервованих у складі колагенових матриць, наведено на рис. 1.

Метаболічну активність клітин оцінювали через добу після відігріву та рекультивування у стандартних умовах (37°C , $5\% \text{CO}_2$). Рівень флуоресценції відновленої форми АВ клітин, кріоконсервованих у вигляді суспензії, був на 15 % нижчим порівняно з рівнем до кріоконсервування (рис. 2).

Метаболічна активність МСК після кріоконсервування у складі колагенової матриці зни-

жувалась на 60 % порівняно з показником контрольної групи (до кріоконсервування).

Таким чином, заморожування тривимірних біологічних конструкцій МСК на відміну від кріоконсервування суспензії МСК, приводить до збереження менше ніж половини життєздатних клітин після відігріву.

Виходячи із необхідності модифікації методу кріоконсервування із застосуванням 10 % ДМСО і ембріональної сироватки, нами було зроблено спробу покращити збереженість клітин за рахунок модифікації методу кріоконсервування.

У раніше проведеній нами серії експериментів [17] був розроблений новий підхід до підвищення стійкості суспензії МСК до кріопошкоджень, який полягає у комплексному використанні сахаридів в якості доповнення до середовища культивування клітин (передобробка), а також до складу кріозахисного розчину. При цьому серед досліджених сахаридів сахароза показала найвищу активність. Запропонований метод модифікації процедури кріоконсервування з використанням сахарози був обраний для подальших досліджень на 3D структурах.

Поєднане додавання сахарози за 24 години до кріоконсервування у середовище культивування МСК та до складу кріозахисного розчину суттєво впливало на життєздатність і власності клітин. Передобробка сахарозою та її включення до кріозахисного розчину дозволяє підвищити показники життєздатності до $(64 \pm 6) \%$ (рис. 3, а). Слід зазначити, що після кріоконсервування не було виявлено відмінностей у життєздатності між клітинами, розташованими на периферії та в більш глибоких шарах колагенових носіїв (у діапазоні до 15—210 мкм глибини). Під час подальшого культивування у складі колагенових матриць клітини були

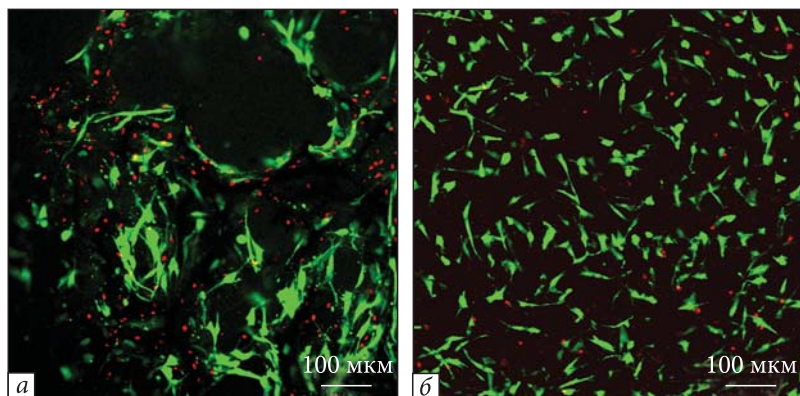
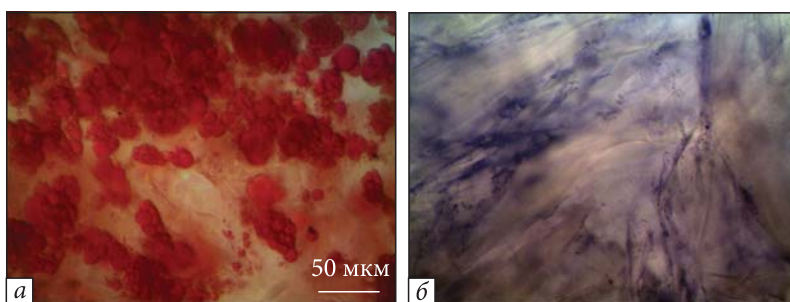


Рис. 3. МСК у складі колагенових матриць, кріоконсервованих під захистом сахарози і 10 % ДМСО, безпосередньо після відігріву (а) та через 5 днів культивування (б). Забарвлення ФДА/ЕБ, конфокальна лазерна мікроскопія

Рис. 4. Здатність МСК до адипогенного (а) та остеогенного (б) диференціювання після кріоконсервування з попередньою передобробкою сахарозою



здатні до проліферації, а мертві залишки поступово елімінувались. На 5-ту добу після відігріву і подальшого рекультивування майже весь об'єм матриці рівномірно заповнювали клітини, що свідчить про активні відновні процеси (рис. 3, б).

Метаболічна активність клітин у складі колагенових матриць, кріоконсервованих із застосуванням сахарози, знижувалась на (40 ± 5) % порівняно з показником до кріоконсервування, що на 18 % вище за результати, отримані без процедури передобробки. Таким чином, у роботі показана можливість підвищення стійкості розпластаних клітин до факторів кріопшкодження шляхом культивування у присутності сахарози.

Слід зазначити, що МСК, кріоконсервовані із застосуванням попередньої передобробки сахарозою, зберігали здатність до мультілінійного диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках: під час культивування в присутності індукторів адипогенезу клітини накопичували нейтральні ліпіди (рис. 4, а), а в присутності остеогенних індукторів експресували лужну фосфатазу (рис. 4, б).

Традиційне моношарове 2D культивування не дозволяє зберегти властивості МСК під час тривалого розмноження, тоді як 3D культивування, яке частково відтворює механізми ре-

гуляції, що діють у природних системах, створює кращі умови для росту МСК [11]. У зв'язку з цим потрібні нові підходи до кріоконсервування клітин у складі матриць.

Результати даної роботи свідчать, що клітини в складі макропористих 3D біоконструкцій дуже чутливі до факторів кріоконсервування. Умови, які забезпечують збереження майже всіх клітин у суспензії після кріоконсервування (повільне двоетапне охолодження в присутності 10 % ДМСО і сироватки), призводять до загибелі половини клітин. Низька ефективність кріоконсервування 3D біоконструкцій обумовлена більш вираженою, порівняно з клітинами у суспензії, дією осмотичних та механічних ефектів, спричинених формуванням кристалів льоду. Досить великі лінійні розміри біоконструкції створюють перешкоди рівномірному розподілу кріопротекторів у різних ділянках матриці. Це обумовлює виникнення локальних ділянок із досить високою концентрацією токсичного кріопротектора, а також ділянок, де через повільну дифузію кріозахисний розчин майже відсутній.

Вочевидь, у процесі кріоконсервування 3D конструкцій на життєздатність клітин впливає чисельна кількість факторів: об'єм зразка, швидкість охолодження та відтавання, фізичні властивості скаффолда та ін. Досліджен-

ню цього питання присвячено декілька робіт. Зокрема, позитивний ефект мав підхід з регулюванням ступеня розпластування клітин на поверхні матриць [7]. Іншими дослідниками було показано, що кріоконсервування в мінімальному об'ємі кріопротектора, так зване кріоконсервування «на повітрі», також дозволяє підвищити показники життєздатності МСК [11]. Ми застосували процедуру попередньої обробки МСК у складі макропористих матриць сахарозою в процесі культивування, це дозволило значно підвищити ефективність їх кріоконсервування. Крім того, ми доповнили кріозахисне середовище сахарозою, яка діє як позаклітинний кріопротектор, підвищує осмолярність середовища, зменшує утворення кристалів льоду всередині клітини та стабілізує плазматичну мембрану під час процесу заморожування. Позитивний вплив застосування сахарози був продемонстрований у роботі з кріоконсервування МСК у складі алогенних біоскафолдів [9]. Результати цієї роботи узгоджуються з дослідженням Х. Ху та співавт. [20], в якому також показано, що під час повільного охолодження прикріплені до поверхні МСК є більш вразливими до дії низьких температур, ніж клітини у суспензії. При цьому швидкість охолодження $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ призводить до значного зниження внутрішньоклітинного рН, деформації філаментів актину та агрегації мітохондрій, ніж під час охолодження з більш повільними швидкостями ($1\text{--}1,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$).

Суттєва відмінність клітин у скафолді порівняно із суспензією полягає в їх прикріпленні до поверхні пор. Одним із можливих пояснень більшої кріочутливості є те, що розпластані клітини мають обмежену здатність до реорганізації цитоскелета у відповідь на зміну осмотичного тиску та формування кристалів льоду. На відміну від клітин у суспензії, які можуть вільно змінювати форму, розпластані клітини зазнають додаткових механічних навантажень, що збільшує ризик пошкодження мембран та загибелі клітин. При цьому відомо, що фізичні властивості матриці суттєво впливають на рівень пошкодження клітин. Результати дослідження впливу релаксації/розтягування клітин на поверхні пор показали, що модульована компресія/декомпресія клітин сприяє кращій прикріпленості та виживанню клітин [1]. Тобто, у випадку використання не жорстких колагенових макропористих матриць, що мають патер-

ни розтягування/стискання, у відповідь на прикладені фізичні сили, які виникають під час кріоконсервування, можна казати про певний ступінь адаптації як цитоскелета, так і залежної від нього мембрани. Можна припустити, що розробка та використання матриць з меншою жорсткістю порівняно з обраними в нашій роботі дозволять отримати більш високі показники життєздатності клітин після кріоконсервування.

Виявлений у наших роботах позитивний ефект попередньої обробки сахарозою на збереженість клітин при кріоконсервуванні може бути обумовлений декількома механізмами. По-перше, впродовж достатньо тривалого культивування клітин (24 години) сахароза може повільно концентраційно-залежним шляхом переноситись через плазматичну мембрану, що може бути обумовлено пасивною дифузією або активним клатрін-залежним шляхом, як показано для трегалози [3]. V. Mutsenko та співавт. з'ясували [13], що підвищення внутрішньоклітинної концентрації сахарози шляхом пермеабілізації МСК електропорацією дозволяє отримати високі показники життєздатності клітин (більш ніж 80 %) після кріоконсервування у відсутності ДМСО та інших кріопротекторів. По-друге, присутність осмотично активної сахарози в культуральному середовищі призводить до часткової дегідратації клітин і, відповідно, до зміни площі та щільності контакту з поверхнею носія. У цьому зв'язку доцільно звернутись до результатів роботи Y. Petrenko та співавт. [16], у якій показано, що МСК, що помірно розпластані на поверхні пор скафолда, менш чутливі до дії кріоконсервування, ніж ті, що довші прикріплювались та мали більшу площу контакту з носієм. Цікаво, що позитивний ефект передобробки сахарозою реалізується тільки в умовах, коли сахароза присутня як в середовищі культивування, так і в середовищі кріоконсервування. За відсутності сахарози в середовищі кріоконсервування вплив передобробки незначний. Цей факт, а також суттєво нижчі показники життєздатності не оброблених сахарозою клітин після кріоконсервування під захистом сахарози [17], можуть обумовлюватися зменшенням внутрішньоклітинної концентрації сахарози за її відсутності в зовнішньому розчині.

Результати роботи свідчать про те, що передобробка сахарозою сприяє збереженості клітин під час кріоконсервування не тільки у суспензії, але і в складі макропористих матриць, де

вони знаходяться у прикріпленому до поверхні стані. Але, незважаючи на суттєве покращення збереженості МСК, запропонований метод кріоконсервування потребує подальшого вдосконалення. Дослідження можуть бути спрямовані на вивчення механізмів посилення резистентності МСК у складі 3D біоконструкцій, захисної дії кріопротекторів, а також на розробку нових типів матриць, оптимізацію режимів насичування розчином кріопротекторів, заморожування та відігріву МСК у складі 3D біоконструкцій.

ВИСНОВКИ

Кріоконсервування МСК у складі 3D матриць із застосуванням програмного повільного за-

морожування під захистом 10 % ДМСО дозволяє зберегти життєздатність і метаболічну активність на рівні (48 ± 4) і (40 ± 5) % відповідно.

Використання сахарози на етапі передобробки і під час подальшого кріоконсервування під захистом 10 % ДМСО забезпечує підвищення показників збереженості клітин у складі макропористих колагенових носіїв на 18 %. У процесі подальшого 3D культивування МСК, кріоконсервовані в складі носіїв із застосуванням передобробки сахарозою, мають типову фібробластоподібну форму, зберігають здатність до мультілінійного диференціювання, активно проліферують і заселяють об'єм колагенової матриці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Almaier S, Ronan LH, Frank S, et al. Cytoskeleton adaptation to stretchable surface relaxation improves adherent cryopreservation of human mesenchymal stem cells. *Cryobiology* [Internet]. 2024 Dec 14 [cited 2025 Feb 10]; 117: 104958. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224024001135>
2. Al-Munajjed AA, Plunkett NA, Gleeson JP, et al. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a sbf immersion technique. *J Biomed Mater Res Appl Biomater*. 2009; 90(2): 584–91.
3. Awan M, Buriak I, Fleck R, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med*. 2020; 15(3): 1463–91.
4. Bathyam O, Batnyam SI, Suye S. Direct cryopreservation of adherent cells on an elastic nanofiber sheet featuring a low glass-transition temperature. *RSC Adv*. 2017; 7: 51264–71.
5. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; 98(8): 2396–402.
6. Castro GR, Larson BK, Panilaitis B, Kaplan DL. Emulsan quantitation by Nile red quenching fluorescence assay. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 67(6): 767–70.
7. Costa PF, Dias AF, Reis RL, Gomes ME. Cryopreservation of cell/scaffold tissue-engineered constructs. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012; 18(11): 852–8.
8. Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. *J Immunol Methods*. 2001; 252(1–2): 131–8.
9. Gurruchaga H, Saenz D, Burgo L, Garate A, et al. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells in an allogeneic bioscaffold based on platelet rich plasma and synovial fluid. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Nov 16 [cited 2025 Feb 14]; 7(1): 15733. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16134-6>
10. Hunt CJ. Technical considerations in the freezing, low-temperature storage and thawing of stem cells for cellular therapies. *Transfus Med Hemother*. 2019; 46(3): 134–49.
11. Khoruzhenko AI. 2D- and 3D-cell culture. *Biopolym Cell*. 2011; 27(1): 17–24.
12. Lin Z, Solomon KL, Zhang X, et al. In vitro evaluation of natural marine sponge collagen as a scaffold for bone tissue engineering. *Int J Biol Sci*. 2011; 7(7): 968–77.
13. Mutsenko V, Barli A, Pezi T, et al. Me₂SO- and preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells using electroporation-assisted delivery of sugars. *Cryobiology*. 2019; 91: 104–14.
14. Petrenko YA, Gorokhova NA, Tkachova EN, Petrenko AY. The reduction by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria. *Ukr Biochem J*. 2005; 77(5): 100–5.
15. Petrenko YA, Ivanov RV, Petrenko AY, Lozinsky VI. 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.
16. Petrenko YA, Katsen-Globa A, Meiser I, Ivanov RV, et al. Cryopreservation of mesenchymal stromal cells within wide-porous three-dimensional alginate-gelatin scaffolds. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2013; 23(4): 351–5.
17. Petrenko YA, Rogulska OY, Mutsenko VV, Petrenko AY. A sugar pretreatment as a new approach to the Me₂SO and xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells. *CryoLetters*. 2014; 35 (3): 239–46.

18. Rogulska O, Trufanova N, Petrenko Y, et al. Generation of bone grafts using cryopreserved mesenchymal stromal cells and microporous collagen-nanohydroxyapatite cryogels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022; 110(2): 489—99.
19. Volkova NA, Mazur SP, Kholodnyy VS, Petrenko AY. Skin stem cells as object for cryopreservation. 1. Skin stem reserve. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2014; 24(1): 3—15.
20. Xu X, Liu Y, Cui Z, et al. Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation. *J Biotechnol*. 2012; 162 (2—3): 224—31.
21. Zuk PA, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13(12): 4279—95.

Отримано 13.02.2025

Прийнято до друку 19.06.2025

N.A. Trufanova *, O.Y. Rogulska, O.A. Semenchenko, O.S. Mishchenko, O.Yu. Petrenko

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

* n.a.trufan@gmail.com

CRYOPRESERVATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS WITHIN MACROPOROUS MATRICES AFTER SUCROSE PRETREATMENT

Mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) attract the attention of scientists and specialists in various fields of medicine due to their high immunomodulatory and regenerative potential, ability to multilineage differentiation. Effective storage technologies are essential for the implementation of MSCs into medical and laboratory practice. The article investigates the effect of pretreatment with sucrose on the viability, metabolic activity and differentiation potential of MSCs after cryopreservation in three-dimensional (3D) macroporous matrices. The results of the study showed that pretreatment with sucrose increased the efficiency of cell cryopreservation in collagen matrices by slow cooling in the presence of 10% DMSO and serum. The viability and metabolic activity of cells after cryopreservation in 3D matrices was significantly higher when treated with sucrose. It was also found that cells after cryopreservation retained the ability to proliferate and multilineage differentiation. The findings suggest that using sucrose for cell pretreatment is a promising approach to reduce cryodamage during their cryopreservation in 3D matrices and opens up new opportunities for increasing the efficiency of storage of tissue-engineered constructs.

Key words: mesenchymal stem cells, pretreatment, sucrose, cryopreservation, DMSO, viability, metabolic activity, induced differentiation, tissue-engineered constructs.