

СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНКАПСУЛЯЦИИ В АЛЬГИНАТНЫЕ МИКРОСФЕРЫ

А. И. Правдюк
Ю. А. Петренко
Н. А. Волкова
А. Ю. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

E-mail: pravduke@yandex.ru

Описано устройство и определены условия для получения альгинатных микросфер. Обсуждаются методы оценки жизнеспособности клеток в составе альгинатного гидрогеля. Установлено, что процедура инкапсуляции не оказывает существенного влияния на жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека. Показано, что после 8-дневного культивирования в составе альгинатных микросфер клетки сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность, что, однако, сопровождается приостановкой пролиферации. После высвобождения из альгинатных микросфер МСК способны адгезировать на поверхность культурального пластика и вступать в пролиферацию. Полученные результаты свидетельствуют о биосовместимости альгинатного гидрогеля как материала для инкапсуляции МСК. Таким образом, МСК, инкапсулированные в альгинатные микросферы, могут быть использованы в клеточных технологиях и тканевой инженерии.

Ключевые слова: альгинат, альгинатные микросферы, инкапсуляция, мезенхимальные стромальные клетки, культивирование.

Инкапсуляция клеток в микросферы из природных и синтетических гидрогелей находит все более широкое применение в биотехнологии, тканевой инженерии, трансплантологии, а также при решении ряда теоретических задач клеточной биологии [1–3].

Материалы для инкапсуляции должны обладать низкой токсичностью, способностью к формированию определенных физико-химических структур, обеспечивающей иммобилизацию клеток, транспорт к ним питательных веществ и выведение продуктов распада, а также поддержание жизнеспособности и функциональной активности клеток при культивировании [4, 5].

Среди веществ природного происхождения, используемых для инкапсуляции живых клеток, одно из первых мест занимает альгинат — линейный полисахарид, состоящий из 1-4-связанных остатков бета-D-маннуроновой и альфа-L-гулуруновой кислот, который получают из бурых водорослей. В присутствии двухвалентных ионов растворы альгината образуют пористый гидрогель, обладающий определенной механической

прочностью, биосовместимостью и способностью деградировать в организме без образования токсических продуктов. Альгинатные гидрогели позволяют диффундировать кислороду, питательным веществам, сигнальным молекулам, но препятствуют диффузии молекул с молекулярной массой выше 100 кДа, например иммуноглобулинов, что обеспечивает иммуноизоляцию и выживание биообъектов, заключенных в эти гидрогели, при имплантации. Такие свойства альгинатных гидрогелей позволили успешно использовать их для инкапсуляции островков поджелудочной железы [6], хондроцитов [7], гепатоцитов [8], сперматозоидов [9], ооцитов [10], генетически модифицированных фибробластов [11], эмбриональных стволовых клеток [12] и др. Однако до настоящего времени не разработаны единые стандартизированные протоколы заключения клеток в альгинатные микросферы.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) характеризуются уникальной способностью к самообновлению и мультилинейной дифференцировке в клетки костной, хрящевой, мышечной, жировой и соедини-

тальной ткани *in vivo* и *in vitro* под действием определенных сигнальных веществ [13]. В настоящее время дискутируется способность МСК дифференцироваться в клетки мезодермального происхождения, такие как гепатоциты [14] и нервные клетки [15]. МСК не экспрессируют гемопоэтические маркеры и являются позитивными по CD 105, CD10, CD13, CD 90, STRO-1. МСК могут быть изолированы из различных источников, таких как костный мозг, жировая и мышечная ткань, кожа, надкостница. Эти клетки отличаются высоким пролиферативным потенциалом, хорошо адгезируют на культуральный пластик, демонстрируют фибробластоподобную морфологию при культивировании в монослое.

Благодаря своим свойствам МСК являются перспективным объектом для тканевой и клеточной инженерии, а также регенеративной медицины и трансплантологии [16]. Однако особенности инкапсуляции МСК и их свойства при культивировании в микросферах остаются малоизученными.

Целью настоящей работы явилось определение условий заключения фетальных стромальных клеток в альгинатные микросферы и изучение состояния инкапсулированных клеток при культивировании.

Материалы и методы

В работе использовали альгинат натрия (АН) с высоким содержанием маннуроновой кислоты и с низкой вязкостью (250 срс; Sigma, США). Перед началом работы растворы альгината натрия стерилизовали путем автоклавирования.

При подборе условий получения альгинатных микросфер варьировали концентрацию раствора альгината натрия в пределах от 0,5 до 2% и хлорида кальция от 1,1 до 2%. Форму микросфер, полученных при различных условиях, оценивали визуально.

В качестве клеток для инкапсуляции использовали МСК фетальных тканей человека 4–8 пассажа, выделенных как описано в работе [17].

Клетки культивировали в монослое в культуральных сосудах с площадью поверхности 25 см² (NUNC) в среде α -MEM (Sigma, США), дополненной 15%-й эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (Биолот), 100 Ед пенициллина, 100 мкг стрептомицина, при 37 °С, 95% влажности в атмосфере с 5% CO₂.

При заполнении непрерывным слоем культуры 60–70% поверхности культурального сосуда клетки снимали с субстрата с помощью смеси трипсин-версена (1:4) по стан-

дартной методике [18] и пересевали в соотношении 1:2. Замену питательной среды производили через каждые 3-е суток.

Перед инкапсуляцией клетки снимали как описано выше, осаждали путем центрифугирования при 700 об/мин в течение 5 мин, промывали средой, содержащей 0,15 М NaCl и 25 мМ HEPES (pH 7,4), и ресуспендировали в растворе альгината натрия. Полученную суспензию с концентрацией 1,2–1,6·10⁶ клеток/мл помещали в стерильный шприц объемом 2 мл и с помощью специально сконструированной насадки распыляли в раствор, содержащий CaCl₂. Альгинатные микросферы с клетками оставляли в растворе CaCl₂ на 10 мин для полимеризации, после чего проводили ступенчатую отмывку от избытка ионов кальция раствором, содержащим 0,15 М NaCl и 25 мМ HEPES. Микросферы с клетками культивировали в лунках 24-луночного планшета (NUNC) в тех же условиях, что и монослойные культуры.

В некоторых экспериментах осуществляли деполимеризацию альгината. Для этого микросферы помещали в раствор, содержащий 0,15 М NaCl и 50 мМ ЭДТА, и интенсивно встряхивали на вортексе. Полученные после растворения альгинатных микросфер клетки отмывали от ЭДТА, переводили в культуральную среду и культивировали в лунках 24-луночного планшета. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева.

Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим (ТС) и по комбинированному окрашиванию флуоресцентными красителями флуоресцеин диацетатом (ФДА) и этидиум бромидом (ЭБ) [19]. Микросферы с клетками, окрашенными флуоресцентными красителями, анализировали с помощью конфокального сканирующего микроскопа с аргонным лазером Carl Zeiss Meta LSM 510. Каждую микросферу сканировали по стандартной конфокальной методике [20], чтобы получить ряд слоев, каждый из которых соответствовал 10 мкм микросферы. С помощью приложения LSM Image Examiner производили сложение слоев и экспорт полученного суммарного изображения в графический файл, который в дальнейшем использовали для подсчета окрашенных клеток.

Для оценки активности пролиферативно-метаболических процессов в МСК в альгинатных микросферах применяли Alamar blue (AB) тест. Клетки в составе альгинатных микросфер культивировали в среде, содержащей 10% раствора редокс-индикатора

АВ (Serotec) в течение 3 ч. После этого производили измерение интенсивности флуоресценции восстановленной формы редокс-индикатора в среде культивирования на планшетном спектрофлуориметре Тесап. В качестве фона служила среда с индикатором без клеток.

Результаты и обсуждение

Получение альгинатных микросфер

Для получения альгинатных микросфер могут быть использованы различные методы с применением электростатических, механических или пневматических воздействий для отрыва капли от стенок капилляра [21]. В настоящей работе был применен пневматический принцип, который достаточно просто реализуется в условиях стерильного бокса и не требует специального оборудования. Для получения альгинатных микросфер использовали специальное устройство (рис. 1), на вход которого подавали углекислый газ из баллона высокого давления, предварительно прошедший стерилизующую фильтрацию через миллиметровый фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Изменяя силу потока с помощью редуктора, получали микросферы диаметром от 500 до 1 000 мкм, обеспечивая при этом достаточно высокую производительность для экспериментальных масштабов — до $5 \cdot 10^6$ клеток/мин, что является важным условием для достижения однородности полимеризации капель по времени. Важным параметром получаемых аль-

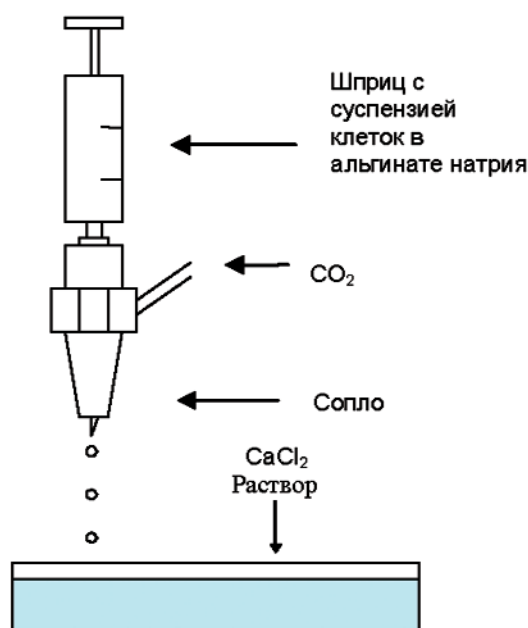


Рис. 1. Схема устройства для получения альгинатных микросфер

гинатных микрокапсул является форма, при этом сферическая геометрия капсул предпочтительнее, поскольку обеспечивает одинаковые условия обмена питательными веществами и сигналами между инкапсулированными клетками и окружающей средой. Было установлено, что форма капсул мало зависит от силы потока CO_2 и в основном определяется концентрацией взаимодействующих растворов альгината натрия и хлорида кальция. Как видно из табл. 1, сферические микросферы были получены при полимеризации капель 2%-го раствора АН в растворах с содержанием CaCl_2 выше 1,4% и полимеризации 1%-го АН в 2%-м растворе CaCl_2 . В остальных вариантах капли АН при контакте с растворами CaCl_2 разной концентрации образовывали дисковидные или полусферические структуры. Наиболее стабильные микросферы сферической формы получали при использовании 1%-го или 2%-го АН в сочетании с 2%-м Ca^{2+} . Для инкапсуляции МСК применяли сочетание 2%-го АН и 2%-го Ca^{2+} . Полученные таким образом микросферы сохраняли сферическую форму в течение всего периода культивирования (6 нед). Вместе с тем, при длительном культивировании (более 2 нед) отмечалось некоторое набухание микросфер, что, очевидно, связано с заменой части ионов кальция на ионы натрия.

Морфология клеток в монослое и микросферах в ходе культивирования

В условиях стандартного монослойного культивирования МСК имели присущую фибробластоподобным клеткам веретеновидную форму (рис. 2, А). Перевод из монослоя в суспензию приводил к округлению клеток. После заключения в альгинатные микросферы клетки сохраняли сферическую форму и демонстрировали ее в течение всего эксперимента (рис. 2, Б).

Жизнеспособность клеток в составе альгинатных микросфер

Для оценки жизнеспособности клеточных суспензий традиционно применяется прижизненное окрашивание трипановым синим. После трипсинизации непрерывного монослоя жизнеспособность МСК в суспензии, определенная по трипановому синему, составляла $95 \pm 3\%$ (табл. 2). Анализ результатов окрашивания клеток трипановым синим в трехмерных структурах с помощью световой микроскопии был затруднителен из-за искажений, обусловленных структурой микросфер, их окрашивания красителем и сложения различных оптических слоев.

Таблиця 1. Форма полимерних альгинатних мікрокапсул при отриманні їх пневматичним методом

Концентрація хлориду кальція, %	Концентрація альгината натрія, %		
	0,5	1,0	2,0
1,1			
1,4			
1,7			
2,0			

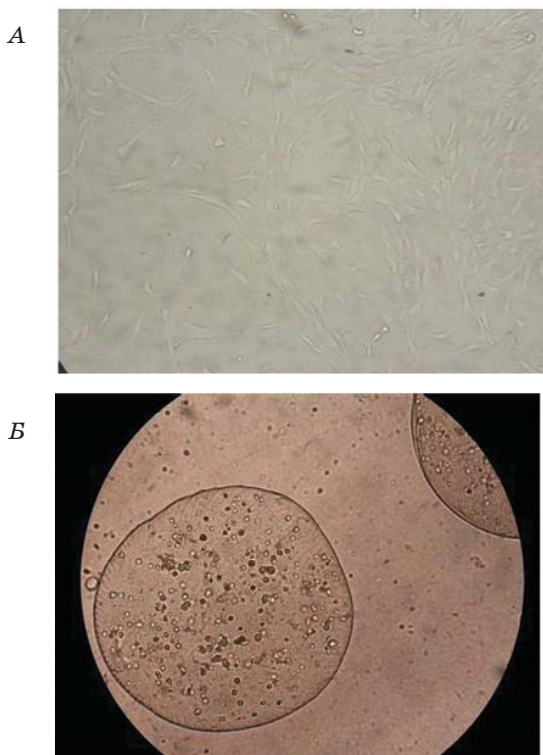


Рис 2. Типична морфологія МСК при культивуванні в монослоє (А) і після інкапсуляції в альгинатні мікросфери (Б)

Для вивчення стану кліток, інкапсульованих в альгинатний гідрогель, в літературі пропонується метод фарбування механічно розбитих альгинатних мікросфер трипановим синім [22]. Однак в наших експериментах цей метод виявився

неефективним, так як трипановий синій фарбував гідрогель, що перешкодило виявленню різниць між інтактними і пошкодженими клітками.

Більш адекватним методом для оцінки стану кліток в мікросферах є фарбування ФДА/ЕБ в поєднанні з конфокальною скануючою лазерною мікроскопією. Цей метод дозволяє оцінювати стан кліток безпосередньо в альгинатних мікросферах без порушення їх цілості. При цьому гідрогель не фарбується і не впливає на спектральні характеристики ФДА і ЕБ. На рис. 3 наведено типову мікрофотографію кліток, фарбованих ЕБ/ФДА. Видно, що більшість кліток в мікросферах демонструє зелену флуоресценцію, що свідчить про їх життєспроможність. Кількісний аналіз показав, що при комбінованому фарбуванні флуоресцентними фарбами ЕБ/ФДА життєспроможність МСК до інкапсуляції становила $92 \pm 3\%$, а в складі мікросфер — $89 \pm 4\%$. Наступне культивування МСК в складі мікросфер не привело до значущої смертності кліток. Так, на 8-й день культивування життєспроможність кліток в мікросферах, оцінена за фарбування ФДА/ЕБ, збереглася на рівні $86 \pm 4\%$.

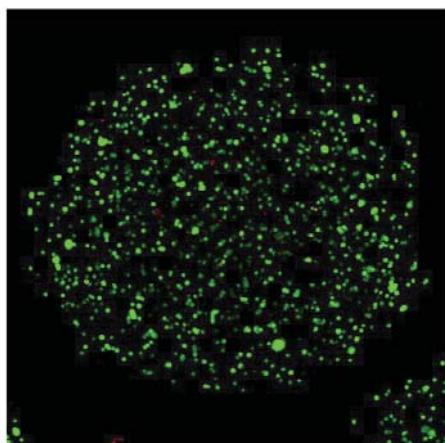


Рис. 3. Общий вид альгинатной микросферы с клетками (окрашивание ФДА/ЭБ, конфокальная лазерная микроскопия, $\times 50$)

Для верификации результатов жизнеспособности по окрашиванию ФДА/ЭБ были проведены эксперименты, в которых альгинатные микросферы растворяли с помощью ЭДТА, а затем определяли жизнеспособность клеток в полученной суспензии с помощью трипанового синего. После растворения микросфер жизнеспособность МСК составила $87 \pm 2\%$ (табл. 2). Это свидетельствует о том, что, во-первых, жизнеспособность клеток можно определять непосредственно в микросферах с помощью окрашивания флуоресцентными красителями, во-вторых — процесс инкапсуляции не вызывает повреждения клеток, а в-третьих — клетки могут быть возвращены в суспензию без существенной потери жизнеспособности.

Таблица 2. Влияние процедуры инкапсуляции на жизнеспособность клеток (в %)

Этапы	Методы определения	
	ТС, %	ФДА/ЭБ, %
Клетки до инкапсуляции	95 ± 3	92 ± 3
Клетки в микросферах	—	89 ± 4
Клетки, выделенные после деполимеризации альгинатных микросфер	87 ± 2	89 ± 2
Клетки в микросферах после 8 дней в культуре	—	86 ± 4

Метаболическая активность инкапсулированных МСК

Сохранение устойчивости плазматической мембраны МСК к витальным красителям при заключении их в альгинатные микросферы не позволяет судить о влиянии этого процесса на метаболическую и пролиферативную активность инкапсулированных

клеток. Для выяснения этого вопроса мы исследовали способность инкапсулированных клеток восстанавливать редокс-индикатор.

Существенным недостатком многих методов, применяемых для оценки метаболической активности, является необходимость использования токсических реагентов и девитализация клеток в ходе анализа. В данной работе использовали тест Alamar blue (АВ), который обладает высокой чувствительностью и не приводит к гибели исследуемых клеток. АВ быстро проникает через биологические мембраны и может быть легко восстановлен внутриклеточными энзимами. После восстановления АВ преобразуется из нефлуоресцирующей «синей» формы с максимальным поглощением при 600 нм в «красную» флуоресцентную форму с максимальным поглощением при 570 нм, что позволяет определять восстановленную форму АВ путем измерения абсорбции или флуоресценции. Накопление восстановленной формы АВ пропорционально активности редокс-энзимов и отображает таким образом метаболическое состояние клетки. Некоторые исследования на долгосрочных культурах растительных клеток, фибробластов, остеобластов, эпителиальных клеток, лимфоцитов, трансформированных клеточных линий и МСК показали, что восстановление АВ коррелирует с жизнеспособностью и пролиферативной активностью клеток [23–25].

Результаты измерений флуоресценции, полученные в данной работе, свидетельствуют о том, что инкапсулированные клетки в ходе культивирования способны восстанавливать АВ. Так, после первых суток культивирования инкапсулированные клетки восстанавливали Alamar blue до значения $1\ 3740 \pm 270$ УЕФ. На 8-е сутки культивирования степень восстановленности составила $9\ 881 \pm 202$ УЕФ. Эти значения в 2–3 раза превышали флуоресценцию фона, что свидетельствует о сохранении метаболической активности клеток при их культивировании в составе АН. С другой стороны, эксперименты с АВ показывают, что при культивировании в составе АН клетки, в отличие от монослоя, не проявляют пролиферативной активности.

Следует отметить, что на более поздних сроках культивирования (4–6 нед) в капсулах иногда отмечалось образование кластеров клеток (рис. 4, А, Б, В, Г). Клетки во вновь образованных кластерах морфологически не отличались от остальных инкапсулированных клеток и не проявляли признаков расплывания.

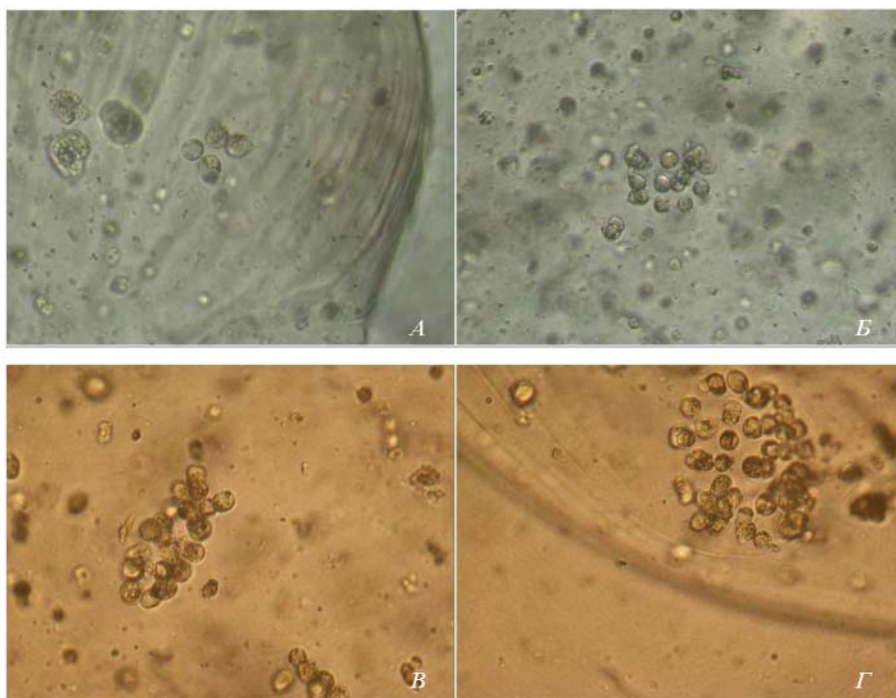


Рис. 4. Формирование кластеров клеток в альгинатных микросферах на 15-е (А, Б), 21-е (В) и 25-е (Г) сутки культивирования

Альгинатный гидрогель обладает способностью к деполимеризации в присутствии хелатирующих агентов. Это позволяет извлекать инкапсулированные клетки и переводить их в суспензию для дальнейшего исследования или применения [26, 27, 28]. В наших экспериментах клетки, полученные после деполимеризации микросфер, культивированных в течение 8 дней, были способны адгезировать на поверхность пластика и вступать в пролиферацию при дальнейшем культивировании.

Описанные в работе условия инкапсуляции МСК в альгинатные микросферы позволяют сохранить жизнеспособность клеток в ходе последующего культивирования. Эти результаты следует рассматривать в перспективе их клинического применения. Трансплантация клеток, инкапсулированных в альгинатные микросферы, может явиться новым эффективным подходом для коррекции различных патологических состояний, таких как инсулинозависимый сахарный диабет, гипопаратиреоз, острая печеночная недостаточность, болезнь Паркинсона и др. В настоящее время долгосрочная трансплантация инкапсулированных гепатоцитов, островков Лангерганса, паратиреоидной ткани, трансформированных фибробластов исследуется в экспериментах на животных. Трансплантация инкапсулированных МСК

также имеет перспективу клинического применения в первую очередь для лечения заболеваний соединительной ткани. Для внедрения этих технологий в медицинскую практику необходимо решить ряд задач. Среди них следует отметить усовершенствование и стандартизацию всех этапов работы с микросферами, что позволит обеспечить инкапсулированным клеткам условия для функционирования *in vitro* и *in vivo*. В частности, необходимо тестировать биосовместимость альгината, поскольку в некоторых коммерческих препаратах присутствуют примеси, обладающие митогенными и цитотоксическими свойствами. Клиническое использование также предполагает разработку эффективных методов низкотемпературного хранения клеток в составе альгинатных микросфер.

Решение этих задач позволит приблизиться к терапевтическому применению МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы.

Таким образом, в работе описано устройство для получения альгинатных микросфер диаметром 500–1 000 мкм и определены концентрации альгината и ионов кальция, обеспечивающие формирование микросфер сферической формы, стабильных при длительном культивировании. Установлено, что процедура инкапсуляции не оказывает

существенного влияния на жизнеспособность клеток. После 8-дневного культивирования в составе альгинатных микросфер клетки сохраняли жизнеспособность и метаболическую активность. Это дает основание для вывода о биосовместимости альгинатного гидрогеля как материала для инкапсуляции МСК.

Морфологические исследования и динамика уровня восстановления АВ в ходе культивирования свидетельствуют о том, что инкапсулированные клетки не проявляли пролиферативной активности. Эти результаты согласуются с данными исследований, проведенных на инкапсулированных фибробластах [29, 30], остеобластах [31], кардиомиоцитах [32] а также на МСК [33, 34].

Известно, что адгезия играет важную роль в процессах пролиферации, дифференцировки и регуляции экспрессии генов [35]. Прикрепление и распластывание фибробластоподобных клеток наступает в результате взаимодействия между интегринами

и пептидными последовательностями, как например ARG-GLY-ASP, которые входят в состав протеинов экстраклеточного матрикса. Можно предположить, что поскольку в структуре альгината эти аминокислотные последовательности не содержатся, биоспецифическая адгезия МСК к гидрогелю не происходит. Это предположение объясняет факт сохранения округлой формы МСК в альгинатном геле. Прямым следствием отсутствия адгезии является остановка пролиферации, что наблюдалось в данной работе.

Несмотря на отсутствие пролиферации, при культивировании в альгинатных микросферах клетки сохраняют жизнеспособность и при переводе в монослойную культуру проявляют адгезивные свойства и восстанавливают способность к пролиферации.

Следовательно, МСК, инкапсулированные в альгинатные микросферы, могут быть использованы в клеточных технологиях и тканевой инженерии.

ЛИТЕРАТУРА

- Zimmermann H., Shirley S. G., Zimmermann U. Alginate-based encapsulation of cells: past, present and future // *Cur. Diabetes Rep.* — 2007. — V. 7, N 4. — P. 314–320.
- Murua A., Portero A., Orive G. et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application // *J. Control. Rel.* — 2008. — V. 132, N 4. — P. 76–83.
- Orive G., Hernandez R. M., Gascon A. R. Cell encapsulation: promise and progress // *Nat. Med.* — 2003. — V. 9, N 1. — P. 104–107.
- Mano J. F., Silva G. A., Azevedo H. S et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends // *J. Royal Soc. Interf.* — 2007. — V. 4, N 17. — P. 999–1030.
- Kim B. S., Baez C. E., Atala A. Biomaterials for tissue engineering // *World J. Urol.* — 2000. — V. 18, N 1. — P. 2–9.
- Vos P. de, Faas M. M., Strand B., Calafiore R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets // *Biomaterials.* — 2006. — V. 27, N 32. — P. 5603–5617.
- Almqvist K., Wang L., Wang J. et al. Culture of chondral in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks // *Ann. Rheum. Diseases.* — 2001. — V. 60. — P. 781–790.
- Hirai S., Kasai S., Mito M. Encapsulated Hepatocyte Transplantation for the Treatment of D-galactosamine-Induced Hepatic Failure in Rats // *Eur. Surg. Res.* — 1993. — V. 25, N 4 — P. 193–202.
- Weber W., Rimann M., Schaefroth T. et al. Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa // *J. Biotechnol.* — 2006. — V. 123, N 2. — P. 155–163.
- Xu M., West E., Shea L. D., Woodruff T. K. Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development // *Biol. Repr.* — 2006. — V. 75, N 6. — P. 916–923.
- Tobias C. A., Dhoot N. O., Wheatley M. A. et al. Grafting of the BDNF-Producing Fibroblasts into the Injured Spinal Cord without Immune Suppression in the Adult Rats // *J. Neurotranspl.* — 2001. — V. 18, N 3. — P. 287–301.
- Maguire T., Novik E., Schloss R., Yarmush M. Alginate-PLL microencapsulation: effect on the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes // *Biotech. Bioengin.* — 2006. — V. 93, N 3. — P. 581–591.
- Abdallah B. M., Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications // *Gene Ther.* — 2008. — V. 15, N 2. — P. 109–116.
- Luk J. M., Wang P. P., Lee C. K. et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intraportal transplantation models // *J. Immun. Meth.* — 2005. — V. 305, N 1. — P. 39–47.
- Dezawa M., Kanno H., Hoshino M. et al. Specific induction of neuronal cells from bone

- marrow stromal cells and application for autologous transplantation // *J. Clin. Invest.* — 2004. — V. 113, N 12. — P. 1701–1710.
16. Tuan R. S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering // *Arthr. Res. Ther.* — 2003. — V. 5, N 1. — P. 32–45.
 17. Петренко А. Ю., Мазур С. П., Петренко Ю. А. и др. Выделение и дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // *Трансплантология.* — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 218–220.
 18. Nolan J. S., Packer L. Monolayer culture techniques for normal human diploid fibroblasts // *Meth. Enzymol.* — 1974. — V. 32, Part B. — P. 561–568.
 19. Dankberg F., Persidsky M. D. A test of granulocyte integrity and phagocytic function // *Cryobiology.* — 1976. — V. 13. — P. 430–432.
 20. Abruzzo T., Cloft H. J., Shengelaia G. G. et al. In vitro effects of transcatheter injection on structure, cell viability, and cell metabolism in fibroblast-impregnated alginate microspheres // *Radiology.* — 2001. — V. 220, N 2. — P. 428–435.
 21. Prusse U., Bilancetti L., Bucko M. et al. Comparison of different technologies for alginate beads production // *Chem. Papers.* — 2008. — V. 62, N 4. — P. 364–374.
 22. Bunger C. M., Jahnke A., Stange J. et al. MTS colorimetric assay in combination with a live-dead assay for testing encapsulated L929 fibroblasts in alginate poly-L-lysine microcapsules in vitro // *Art. Organs.* — 2002. — V 26, N 2. — P. 111–116.
 23. Lee J. K., Kim D. B., Kim J. I., Kim P. Y. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants // *Toxicol. in vitro.* — 2000. — V. 14, N 4. — P. 345–349.
 24. Petrenko Yu. A., Petrenko A. Yu., Damshkaln L. G. et al. Growth and adipogenic differentiation of mesenchymal stromal bone marrow cells during culturing in 3D macroporous agarose cryogel sponges. // *Bull. Experim. Biol. Med.* — 2008. — V. 146, N 1. — P. 129–132.
 25. Petrenko Y. A., Gorokhova N. A., Tkachova E. N., Petrenko A. Y. The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria // *Укр. біохім. журн.* — 2005. — Т. 77, № 1. — С. 100–105.
 26. Grandolfo M., D'Andrea P., Paoletti S. Culture and differentiation of chondrocytes entrapped in alginate gels // *Calcified Tiss. Intern.* — 1993. — V. 52, N 1. — P. 42–48.
 27. Tomkoria S., Masuda K., Mao J. Nanomechanical properties of alginate-recovered chondrocyte matrices for cartilage regeneration // *J. Eng. Med.* — 2007. — V. 221, N 5. — P. 467–473.
 28. Lee D. A., Reisler T., Bader D. L. Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques // *Acta Orth.* — 2003. — V. 74, N 1. — P. 6–15.
 29. Hunt N. C., Shelton R. M., Grover L. M. Reversible mitotic and metabolic inhibition following the encapsulation of fibroblasts in alginate hydrogels // *Biomaterials.* — 2009. — V. 30, N 32. — P. 6435–6443.
 30. Hunt N. C., Shelton R. M., Grover L. M. An alginate hydrogel matrix for the localised delivery of a fibroblast/keratinocyte co-culture // *Biotech. J.* — 2009. — V. 4, N 5. — P. 730–737.
 31. Kuo C. K., Ma P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffold for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties // *Biomaterials.* — 2001. — V. 22, N 6. — P. 511–521.
 32. Dar A., Shachar M., Leor J., Cohen S. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds // *Biotech. Bioeng.* — 2002. — V. 80, N 3. — P. 305–312.
 33. Ma H. L., Hung S. C., Lin S. Y. et al. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads // *J. Biomed. Mater.* — 2003. — V. 64, N 2. — P. 273–281.
 34. Duggal S., Fronsdal K. B., Szoke K. Phenotype and gene expression of human mesenchymal stem cells in alginate scaffolds // *Tiss. Eng. Part A.* — 2009. — V. 15, N 7. — P. 1763–1773.
 35. Retta S. F., Ternullo M., Tarone G. Adhesion to matrix proteins // *Meth. Mol. Biol.* — 1999. — V. 96. — P. 125–130.

**ВЛАСТИВОСТІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ
СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН
ЗА ІНКАПСУЛЯЦІЇ В АЛЬГІНАТНІ
МІКРОСФЕРИ**

*А. І. Правдюк
Ю. А. Петренко
Н. А. Волкова
А. Ю. Петренко*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: pravduke@yandex.ru

Описано пристрій і визначено умови для отримання альгінатних мікросфер. Обговорюються методи оцінки життєздатності клітин у складі альгінатного гідрогелю. Встановлено, що процедура інкапсуляції не справляє істотного впливу на життєздатність мезенхімальних стромальних клітин (МСК). Показано, що після 8-денного культивування у складі альгінатних мікросфер клітини зберігають життєздатність і метаболічну активність, що, проте, супроводжується припиненням проліферації. Після вивільнення з альгінатних мікросфер МСК здатні адгезувати на поверхню культурального пластика і вступати в проліферацію. Отримані результати свідчать про біосумісність альгінатного гідрогелю як матеріалу для інкапсуляції МСК. Таким чином, МСК, інкапсульовані в альгінатні мікросфери, можуть бути використані в клітинних технологіях і тканинній інженерії.

Ключові слова: альгінат, альгінатні мікросфери, інкапсуляція, мезенхімальні стромальні клітини, культивування.

**PROPERTIES OF MESENCHYMAL
STROMAL HUMAN CELLS
ENCAPSULATED
IN ALGINATE MICROBEADS**

*A. I. Pravdyuk
Yu. A. Petrenko
N. A. Volkova
A. Yu. Petrenko*

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

E-mail: pravduke@yandex.ru

Device and conditions for alginate microbead generation are described. Methods for cell viability evaluation in alginate hydrogel are discussed. Encapsulation procedure was shown to have no significant influence on mesenchymal stromal cell (MSC) viability. It was found that the cells cultivated in alginate microbeads during 8 days maintained viability and metabolic activity however it was accompanied with proliferation stoppage. MSC released from alginate hydrogel were able to adhere to cultural plastic and renew proliferation. The results obtained allow to consider alginate hydrogel as biocompatible material for encapsulation of MSC. Therefore MSC encapsulated in alginate microbeads can be applied to cell technologies and tissue engineering.

Key words: alginate, alginate microbeads, encapsulation, mesenchymal stromal cells, cultivation.