

УДК 611.018.46.085.23:615.014.41

А.А. Лаврик*, А.В. Трифонова, А.К. Гулевский

Выбор сред для культивирования и криоконсервирования стромальных клеток костного мозга

UDC 611.018.46.085.23:615.014.41

A.A. Lavrik*, A.V. Trifonova, A.K. Gulevskiy

Choice of Media for Cultivation and Cryopreservation of Bone Marrow Stromal Cells

Ключевые слова: стромальные клетки костного мозга, культивирование, криоконсервирование.

Ключові слова: стромальні клітини кісткового мозку, культивування, криоконсервування.

Key words: bone marrow stromal cells, cultivation, cryopreservation.

В настоящее время в рамках регенеративной медицины разрабатываются методы лечения широкого спектра болезней с применением аутологичных стромальных клеток. Положительные результаты были получены в терапии сердечно-сосудистых, эндокринных и нервных заболеваний, а также при восстановлении поврежденных костной и хрящевой тканей [5]. Современные эффективные методы выделения стромальных клеток у пациента установлены и описаны многими исследователями [9, 10], однако относительно методов культивирования и длительного хранения литературные данные достаточно разнообразны [1, 6, 8]. Целью данной работы было сравнить влияние широкоприменимых сред на ростовые свойства культуры стромальных клеток костного мозга.

В работе были исследованы стромальные клетки, выделенные из костного мозга (СК КМ) [9] лабораторных белых беспородных крыс, на третьем – четвертом пассажах культивирования. Культура на указанных пассажах была однородной, клетки имели фибробластоподобную морфологию. Плотность посева составляла 10^4 кл./см². Культивирование проводили в матрасах площадью 75 см² с использованием различных ростовых сред: 1 – 99% среды DMEM/F12 (готовая среда), 1% FBS; 2 – 98% среды DMEM/F12, 2% FBS; 3 – 95% среды DMEM/F12, 5% FBS; 4 – 90% среды DMEM/F12, 10% FBS; 5 – 99% смеси сред DMEM и F12 (1:1) (смесь *ex tempore*), 1% FBS; 6 – 98% смеси сред DMEM и F12 (1:1), 2% FBS; 7 – 95% смеси сред DMEM и F12 (1:1), 5% FBS; 8 – 90% смеси сред DMEM и F12 (1:1), 10% FBS.

В работе были использованы следующие базовые среды: готовая смесь DMEM/F12 с *L*-глутамином,

Due to the needs of regenerative medicine nowadays the methods for treating a wide range of diseases using autological stromal cells have been developed. Positive results were obtained during therapies of cardiovascular, endocrine and nerve diseases as well as in recovering of injured bone and cartilage tissues [9]. Current effective methods for isolation of stromal cells from a patient have been established and described by many researchers [6, 10], however, the reports about proper methods of culturing and long-term storage are still quite diverse [1, 5, 8]. The research aim was to compare the effect of traditional media on growth properties of the cultured bone marrow stromal cells.

The research was done in bone marrow stromal cells (BMSCs) [6] isolated from laboratory breadless white rats, at the 3rd/4th culturing passages. The culture at the mentioned passages was homogenous, the cells had fibroblast-like morphology. The plating density made 10^4 cells/cm². Culturing was performed in 75 cm² flasks using different growth media: 1 – 99% DMEM/F12 (ready medium), 1% FBS; 2 – 98% DMEM/F12, 2% FBS; 3 – 95% DMEM/F12, 5% FBS; 4 – 90% DMEM/F12, 10% FBS; 5 – 99% mixture of DMEM and F12 (1:1) (*ex tempore* prepared mixture), 1% FBS; 6 – 98% mixture of DMEM and F12 (1:1), 2% FBS; 7 – 95% mixture of DMEM and F12 (1:1), 5% FBS; 8 – 90% mixture of DMEM and F12 (1:1), 10% FBS.

The following basic media were involved: ready mixture of DMEM/F12 with *L*-glutamine, DMEM with *L*-glutamine, F12 (all the media from PAA, Austria) and fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, USA).

The cells were cryopreserved without controlled rate freezer according to the protocol: step 1 – equilibration of cells in cryoprotective medium at room temperature

Отдел биохимии холодовой адаптации, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: a_lavrik@rambler.ru

Поступила 08.04.2014
Принята в печать 12.09.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №1. – С. 81–85.
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Biochemistry of Cold Adaptation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: a_lavrik@rambler.ru

Received April, 08, 2014
Accepted September, 12, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(1): 81–85.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

DMEM с *L*-глутамином, F12 (все среды производства «РАА», Австрия) и фетальная бычья сыворотка (FBS) («Sigma-Aldrich», США).

Клетки криоконсервировали без аппарата программного замораживания по схеме: 1 – эquilibrация клеток в криозащитной среде при комнатной температуре (20...22°C) в течение 15–20 мин; 2 – охлаждение криопробирок («Sarstedt», Германия) в течение 60 мин в открытых криостативах при постоянной температуре в камере холодильника (–20°C); 3 – помещение криопробирок в заранее охлажденную при –20°C пенопластовую коробку с толщиной стенок 1 см и дальнейшее ее охлаждение в течение 60 мин при постоянной температуре в камере холодильника (–80°C); 4 – быстрое погружение криопробирок в жидкий азот. Данная схема обеспечивает такой режим замораживания: охлаждение со средней скоростью 1 град/мин до –80°C (в течение 2 ч) с последующим погружением в жидкий азот (–196°C) [2].

В работе использовали следующие криозащитные среды: а – 80% среды DMEM, 10% FBS, 10% ДМСО; б – 85% среды DMEM, 10% FBS, 5% ДМСО; в – 70% среды DMEM, 20% FBS, 10% ДМСО; г – 75% среды DMEM, 20% FBS, 5% ДМСО; д – 90% FBS, 10% ДМСО; е – 95% FBS, 5% ДМСО. Замороженные образцы отогревали в течение 40–60 с на водяной бане при 40°C и удаляли криопротектор.

Для первичной оценки сохранныости клеток после криоконсервирования использовали экспресс-метод окрашивания витальным красителем трипановым синим [3]. Пролиферативное состояние культуры оценивали по индексу пролиферации (ИП) – отношение количества снятых на 3-и сутки культивирования клеток к количеству посеянных. Количество клеток подсчитывали стандартным лабораторным методом в счетной камере Горяева. Для определения количества колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) производили посев клеток с плотностью $2 \times 10^3/\text{см}^2$. На 3-и сутки культивирования монослой промывали раствором Хенкса, фиксировали спиртукусной смесью и окрашивали по методу Романовского-Гимзы. Подсчет КОЕ-Ф проводили с помощью светового микроскопа «PZO-Waszawa» (Польша) при увеличении объектива $\times 45$.

Для статистического анализа экспериментальных данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение. Различия между данными считали значимыми при $p < 0,05$.

На первом этапе работы мы сравнивали влияние базовых сред и различных концентраций сыворотки крови в средах культивирования на прирост СК КМ в культуре. Базовой средой была выбрана смесь сред DMEM и F12 (1:1). При культивировании СК различного происхождения это наиболее популярная среда, характеризующаяся тем, что она сочетает богатый

(20...22°C) for 15–20 min; step 2 – cooling of cryovials (Sarstedt, Germany) for 60 min in open cryo-holders at constant temperature in refrigerator chamber (–20°C); step 3 – placing cryovials into pre-cooled at –20°C foamed plastic box with 1 cm walls and further cooling for 60 min at constant temperature in a refrigerator chamber (–80°C); step 4 – rapid plunging of cryovials into liquid nitrogen. This protocol provides the freezing regimen as follows: cooling with an average range of 1 deg/min down to –80°C (for 2 hrs) with following plunging into liquid nitrogen (–196°C) [3].

The following cryoprotective media were used: a – 80% DMEM, 10% FBS, 10% DMSO; b – 85% DMEM, 10% FBS, 5% DMSO; c – 70% DMEM, 20% FBS, 10% DMSO; d – 75% DMEM, 20% FBS, 5% DMSO; e – 90% DMEM, 10% DMSO; f – 95% DMEM, 5% DMSO. Frozen samples were thawed for 40–60 seconds in water bath at 40°C and cryoprotectant was removed.

For primary assessment of post-thaw viability of cells the express method of trypan blue vital stain was used [2]. Proliferative state of culture was estimated on proliferation index (PI), *i. e.* the ratio of the number of the cells collected to the 3rd culturing day to the number of those plated. The number of cells was calculated by standard laboratory method in Goryaev's chamber. To examine the number of colony forming units of fibroblasts (CFU-F) the cells were plated with the density of $2 \times 10^3/\text{cm}^2$. To the 3rd culturing day the monolayer was washed with Hanks solution, fixed with alcohol-acetic acid and stained according to Romanowsky-Giemsa. CFU-F were calculated using light microscope PZO-Warzewa (Poland) with $\times 45$ magnification.

For statistical analysis of experimental data there was used non-parametric Mann-Whitney U-test. The results were presented as a mean \pm SD. The differences between the data were considered as statistically significant at $p < 0.05$

At the first stage of the research we compared the effect of basic media and different concentrations of blood serum in culturing media on increment of the BMSCs in culture. As the basic medium we selected the mixture of DMEM and F12 (1:1). For culture of the SCs of various origin this is the most applied medium the feature of which is the combination of rich composition of F12 medium and high concentration of the DMEM components, in particular it contains 10,066 mg/l of inorganic salts, 1,100 mg/l amino acid, 33.6 mg/l vitamins and other components, its pH is 7.0–7.4, and 260–320 mOsm/kg osmolarity [7].

The mentioned mixture of media can be used both as ready one and prepared *ex tempore*. It has been established that the results of application of the basic media both ready commercial one DMEM/F12 (Fig. 1, columns 1–4) and the mixture of DMEM and F12 prepared *ex tempore* (Fig. 1, columns 5–8) do not differ.



состав среды F12 и высокую концентрацию компонентов среды DMEM, а также содержит 10066 мг/л неорганических солей, 1100 мг/л аминокислоты, 33,6 мг/л витамины и другие компоненты, имеет pH 7,0–7,4, осмоляльность 260–320 мОсмоль/кг [7].

Указанную смесь сред можно использовать как в готовом виде, так и приготовить *ex tempora*. Установлено, что результаты применения в качестве базовой готовой коммерческой среды DMEM/F12 (рис. 1, варианты 1–4) и смеси сред DMEM и F12, приготовленной *ex tempora* (рис. 1, варианты 5–8), не отличаются.

Культивирование СК КМ в средах с низким содержанием сыворотки крови (1–2%) приводило к незначительному приросту культуры. Индекс пролиферации в большинстве вариантов на 3-и сутки культивирования не достигал 2. При использовании в средах культивирования 5- и 10%-й сыворотки крови данный показатель составлял от 3,26 до 4,0. Все обнаруженные отличия между указанными вариантами, при использовании различных базовых сред и концентраций сыворотки крови 5 и 10%, были незначимы.

Как правило, исследователи подсчитывают колонии размером от 50 клеток и более (КОЕ-Ф_{≥50}) на 7–14-е сутки культивирования [5]. На 3-и сутки культивирования было целесообразно провести подсчет колоний меньшего размера – от 20 клеток и более (КОЕ-Ф_{≥20}). Установлено, что количество КОЕ-Ф_{≥20} при культивировании СК КМ в среде, содержащей 5% сыворотки крови, больше, чем в среде с 10% сыворотки крови (71,7 ± 2,6 и 55,3 ± 4,9 соответственно). Напротив, количество крупных колоний (КОЕ-Ф_{≥50}) в среде с 10% сыворотки крови было выше по сравнению с 5% сыворотки (30,7 ± 2,6 и 23,0 ± 3,8 соответственно). Несмотря на то, что по ИП значимых отличий между вариантами с использованием 5 и 10% сыворотки крови получено не было, можно сказать, что культивирование СК КМ в среде с 10% сыворотки крови приводит к формированию крупных колоний в более ранние сроки по сравнению со средой, содержащей 5% сыворотки крови.

Таким образом, использование при культивировании СК КМ смеси сред DMEM и F12 (1:1) с добавлением 10% FBS обеспечивало из исследованных вариантов наилучшие показатели роста культуры.

Вторым этапом нашей работы было сравнение влияния состава криозащитной среды на сохранность СК КМ после криоконсервирования и на скорость дальнейшего роста культуры. Из рис. 2 можно видеть, что сохранность клеток, установленная по окрашиванию трипановым синим, по мере увеличения концентрации сыворотки крови в составе криозащитной среды, повышалась. При этом использованные концентрации криопротектора ДМСО в наших экспериментах на этот показатель не влияли. При содержании в криозащитной среде 10% сыворотки крови сохранность СК КМ находилась на уровне 65–

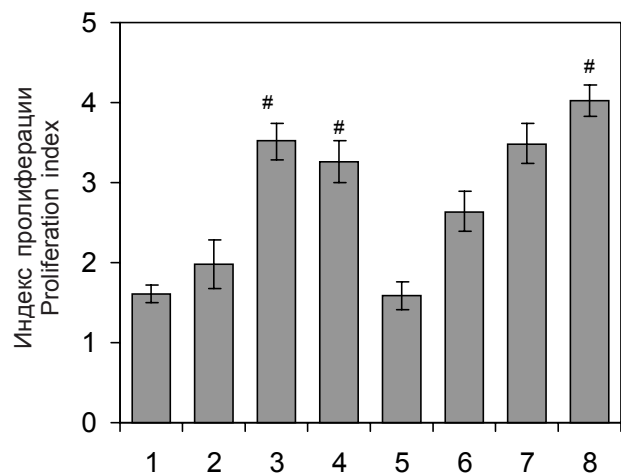


Рис. 1. Прирост клеток на 3-и сутки культивирования культуры СК КМ в различных ростовых средах ($n = 5$): 1 – 99% среды DMEM/F12 (готовая среда), 1% FBS; 2 – 98% среды DMEM/F12, 2% FBS; 3 – 95% среды DMEM/F12, 5% FBS; 4 – 90% среды DMEM/F12, 10% FBS; 5 – 99% смеси сред DMEM и F12 (1:1) (смесь *ex tempora*), 1% FBS; 6 – 98% смеси сред DMEM и F12 (1:1), 2% FBS; 7 – 95% смеси сред DMEM и F12 (1:1), 5% FBS; 8 – 90% смеси сред DMEM и F12 (1:1), 10% FBS; # – различия статистически значимы относительно варианта соответствующей базовой среды с добавлением 2% FBS.

Fig. 1. Expansion of the BMSC culture to 3rd day in various growth media ($n = 5$): 1 – 99% DMEM/F12 (ready medium), 1% FBS; 2 – 98% DMEM/F12, 2% FBS; 3 – 95% DMEM/F12, 5% FBS; 4 – 90% DMEM/F12, 10% FBS; 5 – 99% mixture of DMEM and F12 (1:1) (*ex tempora* prepared mixture), 1% FBS; 6 – 98% mixture of DMEM and F12 (1:1), 2% FBS; 7 – 95% mixture of DMEM and F12 (1:1), 5% FBS; 8 – 90% mixture of DMEM and F12 (1:1), 10% FBS; # – differences are statistically significant if compared with corresponding basic medium supplemented with 2% FBS.

Culturing of BMSCs in the media with low blood serum content (1–2%) resulted in insignificant increment of the culture. The proliferation index did not reach 2 in the majority of variants to the 3rd culturing day. Using of 5 and 10% blood serum in culturing media allowed the proliferation index to reach 3.26–4.0. All the found differences between the mentioned variants when applying various basic media and concentration of blood serum of 5 and 10% were insignificant.

As a rule the researchers count the CFU-F colonies with 50 cells and more (CFU-F_{≥50}) to the 7–14th culturing days [4]. To the 3rd culturing day it is expedient to count the colonies of smaller dimensions, *i. e.* from 20 cells and more (CFU-F_{≥20}). It has been established that the number of CFU-F_{≥20} during culture of BMSCs in the medium containing 5% blood serum was higher, if compared with case of 10% blood serum (71.7 ± 2.6 and 55.3 ± 4.9, correspondingly). And *vice versa*, the number of large colonies (CFU-F_{≥50}) was higher in the medium with 10% blood serum if compare with case of 5% (30.7 ± 2.6 and 23.0 ± 3.8, correspondingly). In spite of the fact that in terms of PI no statistically

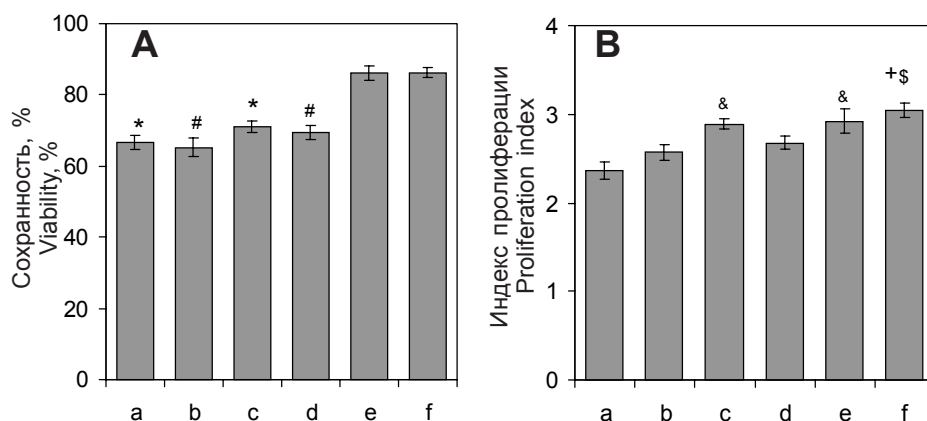


Рис. 2. Сохранность СК КМ (А) и прирост клеток на 3-и сутки культивирования (В) после размораживания культуры, хранящейся в жидком азоте в различных криозащитных средах: **a** – 80% среды DMEM, 10% FBS, 10% ДМСО; **b** – 85% среды DMEM, 10% FBS, 5% ДМСО; **c** – 70% среды DMEM, 20% FBS, 10% ДМСО; **d** – 75% среды DMEM, 20% FBS, 5% ДМСО; **e** – 90% FBS, 10% ДМСО; **f** – 95% FBS, 5% ДМСО; различия статистически значимы по сравнению с ($p < 0,05$): * – средой **e**; # – **f**; & – **a**; + – **b**; \$ – **d**.

Fig. 2. Post-thaw viability of BMSCs (A) and expansion of cell culture to the 3rd day (B) following storage in liquid nitrogen in various cryoprotective media: **a** – 80% DMEM, 10% FBS, 10% DMSO; **b** – 85% DMEM, 10% FBS, 5% DMSO; **c** – 70% DMEM, 20% FBS, 10% DMSO; **d** – 75% DMEM, 20% FBS, 5% DMSO; **e** – 90% DMEM, 10% DMSO; **f** – 95% DMEM, 5% DMSO; differences are statistically significant ($p < 0.05$) if compared with: * – medium **e**; # – **f**; & – **a**; + – **b**; \$ – **d**.

67% при обеих концентрациях ДМСО (рис. 2, А, варианты *a, b*), при содержании 20% сыворотки крови – 69–71% (рис. 2, А, варианты *c, d*), а при 90 и 95% – 86% (рис. 2, А, варианты *e, f*), что значимо отличалось от предыдущих вариантов.

В результате дальнейшего культивирования деконсервированных СК КМ самый высокий ИП был отмечен в вариантах *c, e, f*, и составил $2,89 \pm 0,06$, $2,92 \pm 0,14$ и $3,4 \pm 0,18$ соответственно. При сравнении вариантов с одинаковым содержанием ДМСО в криозащитной среде было установлено, что при его 10% концентрации наименьшая скорость роста в дальнейшем соответствовала варианту с самым низким содержанием сыворотки крови (10%) в составе криозащитной среды (рис. 2, В, вариант *a*), а при 5%-й концентрации ДМСО наибольшую скорость роста имел вариант с 95% сыворотки крови (рис. 2, В, вариант *f*). Отличий между вариантами, в которых использовались одинаковое содержание сыворотки крови и различные концентрации криопротектора, не обнаружено.

Таким образом, наиболее эффективным было криоконсервирование СК КМ в криозащитной среде, содержащей 95% сыворотки крови и 5% ДМСО. Это обеспечивало максимальную сохранность клеток и наилучшие ростовые свойства культуры СК КМ после деконсервирования.

Проведенные эксперименты по оценке сред для культивирования и криоконсервирования СК КМ крыс позволили установить наиболее эффективные условия

significant differences between the variants between 5 and 10% blood serum were found, it could be concluded that culture of BMSCs in the medium with 10% blood serum resulted in formation of larger colonies in earlier terms if compared with the medium containing 5% blood serum.

Thus, use of the mixture of DMEM and F12 (1:1) supplemented with 10% FBS for BMSCs culturing provided the best culture growth indices (CFU-F_{≥50}) among the studied variants.

The second stage of our work was to compare the effect of cryoprotective medium composition on preservation rate of BMSCs following cryopreservation as well as on the rate of further culture growth. Fig. 2A shows that cell viability rate

(in terms of trypan blue staining) increased with the rise in concentration of blood serum included to cryoprotective medium. Herewith, the variation of DMSO cryoprotectant concentrations in our experiments did not affect this index. When the content of blood serum in cryoprotective medium was 10% the viability of BMSCs was 65–67% at both concentrations of DMSO (Fig. 2A, columns *a, b*), if the content was 20% the index was within the range of 69–71% (Fig. 2A, columns *c, d*) and at 90 and 95% concentrations it was 86% (Fig. 2, columns *e, f*), that was significantly different from previous variants.

As a result of further culturing of thawed BMSCs the highest PI was revealed in the variants *c, e* and *f* and made 2.89 ± 0.06 , 2.92 ± 0.14 and 3.4 ± 0.18 , correspondingly. Comparing the variants with the same content of DMSO in cryoprotective medium showed that if the cryoprotectant concentration was 10% the lowest growth rate during further culture was found in the case with the lowest content of blood serum (10%) in cryoprotective medium (Fig. 2B, column *a*), and if DMSO concentration was 5% the highest growth rate was observed in the case of 95% blood serum (Fig. 2B, column *f*). No differences between the cases with same content of blood serum but different content of cryoprotectant were found.

Thus, the most effective cryopreservation of BMSCs was if cryoprotective medium contained 95% blood serum and 5% DMSO. This provided the highest viability of cells and the best growth features of BMSCs culture post-thaw.



для проведения дальнейших исследований, направленных на снижение негативного влияния криоконсервирования на пролиферацию и другие функциональные характеристики СК КМ.

Литература

1. Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников выделенных из костного мозга крыс // Цитология. – 2007. – Т. 49, №1. – С. 40–47.
2. Грищенко В.И., Лобынцева Г. С., Вотякова И.А., Шершков С.И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование): монография. – К.: Наукова думка, 1988. – 190 с.
3. Животная клетка в культуре / Под ред. Л.П. Дьяконова, В.И. Ситькова. – Ставрополь, 2000. – 400 с.
4. Коваленко В.Н., Лысенко И.В., Панченко Л.М. Культура стволовых стромальных клеток костного мозга человека как модель для изучения прямого влияния фармакологических препаратов при остеоартрозе // Укр. ревматолог. журнал. – 2006. – Т. 25, №3. – С. 45–48.
5. Материалы Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». – М., 2010. – 91 с.
6. Скоробогатова Н.Г., Петренко Ю.А., Волкова Н.А. и др. Влияние криоконсервирования на дифференцировочные свойства мезенхимальных стромальных клеток-предшественников фетальной печени и костного мозга взрослого человека // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №4. – С. 410–412.
7. Пат. №2351647 РФ, МПК C12N 5/00. Питательная среда для культивирования клеток и тканей пресноводных моллюсков / Сеид-Гусейнов А.А., Ковтун Н.Е.; заявл. 31.07.2007; опубл. 10.04.2009.
8. Kyoko Shimizu, Masato Sakai, Mamiko Ando et al. Newly developed primary culture of rat visceral adipocytes and their in vitro characteristics // Cell Biology International. – 2006. – Vol. 30. – P. 381–388.
9. Owen M. Marrow stromal stem cells. // J. Cell Science Suppl. – 1988. – №10. – P. 63–76.
10. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // Tissue Engineering. – 2001. – Vol. 7, №2. – P. 211–228.

The performed experiments on assessment of the media for culturing and cryopreservation of BMSCs of rats allowed to establish the most efficient conditions to carry-out the following studies intended to reduce the negative effect of cryopreservation on proliferation and other functional parameters of BMSCs.

References

1. Anokhina E.B., Buravkova L.B. Heterogeneity of stromal precursor cells isolated from rat bone marrow. Tsitologiya 2007; 49(1): 40–47.
2. Diakonov L.P., Sitkov V.I. et al. Biology of animal cells. Stavropol; 2000.
3. Grischenko V.I., Lobyntseva G.C., Votyakova I.A., Sherskov S.I. Hematopoietic cells of human fetal liver (embryogenesis, cryopreservation and transplantation): monograph. Kiev: Naukova dumka; 1988.
4. Kovalenko V.N., Lysenko I.V., Panchenko O.M. Culture of stem stromal marrow cells as a model for the study of direct influence of pharmacological medicines at osteoarthritis. Ukr Rheumatological J 2006; 25(3): 45–48.
5. Kyoko Shimizu, Masato Sakai, Mamiko Ando et al. Newly developed primary culture of rat visceral adipocytes and their in vitro characteristics. Cell Biology International 2006; 30: 381–388.
6. Owen M. Marrow stromal stem cells. J Cell Science Suppl. 1988; 10: 63–76.
7. Seid-Guseynov A.A., Kovtun N.E. Growth media for cultivation of freshwater clam cells and tissues. Patent of Russian Federation 2351647 (7) C12N 5/00. 2009. April 10.
8. Skorobogatova N.G., Petrenko Yu.A., Volkova N.A., Petrenko A.Yu. Cryopreservation effect on differentiation capacities of mesenchymal stromal progenitor cells from human fetal liver and adult bone marrow. Problems of cryobiology 2008; 18(3): 410–412.
9. The Materials of the Russian Scientific Workshop 'Stem Cells and Regenerative Medicine'. Moscow. 2010.
10. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Engineering 2001; 7(2): 211–228.

