

Оглядова стаття = Review article = Обзорная статья

УДК 612.014:542.46 «312»

Сучасні підходи до кріоконсервування клітин мезенхімального походженняМаслова О.О.¹, Дерябіна О.Г.¹, Пічкур Л.Д.², Вербовська С.А.², Акінола С.Т.²¹ Відділ генних технологій, Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ, Україна² Відділення відновлювальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, УкраїнаНадійшла до редакції 12.12.16.
Прийнята до публікації 27.12.16.**Адреса для листування:**Пічкур Леонід Дмитрович,
Відділення відновлювальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна, 04050, e-mail: wurra@yandex.ru

Проблема лікування запально-дегенеративних захворювань центральної нервової системи (ЦНС) людини актуальна. Прогрес в лікуванні цих захворювань пов'язують з розвитком клітинних технологій. Одними з найперспективніших для використання в клінічній практиці є клітини вартонових драглів пуповини (пупкового канатика), при отриманні яких не виникає морально-етичний конфлікт, процедура їх виділення досить проста. Зважаючи на перспективи клінічного застосування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) пуповини людини, постає питання вибору оптимального методу їх тривалого зберігання (кріоконсервування), зокрема, режиму заморожування, виду кріопротектора, тривалості зберігання. Проаналізовані огляди літератури останніх років про способи кріоконсервування МСК, зокрема, отриманих з тканини пуповини людини.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини; мультипотентні клітини; кріозбереження; кріопротектори; диметилсульфоксид.

Український нейрохірургічний журнал. — 2017. — №1. — С.5-10.

Modern approaches to cryopreservation of mesenchymal stem cellsOlga O. Maslova¹, Olena G. Deriabina¹, Leonid D. Pichkur², Svetlana A. Verbovska², Samuel T. Akinola²¹Department of Gene Technology, Institute of Genetic and Regenerative Medicine of NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine²Restorative Neurosurgery Department, Romodanov Neurosurgery Institute, NAMS of Ukraine, Kiev, UkraineReceived, December 12, 2016.
Accepted, December 27, 2016.**Address for correspondence:**

Leonid Pichkur, Restorative Neurosurgery Department, Romodanov Neurosurgery Institute, 32 Platona Maiborody st., Kiev, Ukraine, 04050, e-mail: wurra@yandex.ru

The problem of treating inflammatory and degenerative lesions of the central nervous system remains relevant. In recent years, advances in the treatment of diseases are associated with the development of cellular technology. The umbilical cord stem cells exhibit the most promise for use in clinical practice. Its recovery does not raise any moral and ethical conflicts, and the culturing process is quite simple. The prospect of clinical application of human umbilical cord mesenchymal stem cells raises a question of choosing the optimal method for long-term storage (cryopreservation) considering freezing mode, type of cryoprotectants and storage time. This review focuses on the analysis of recent papers about cryopreservation of mesenchymal stem cells, including umbilical cord stem cells.

Keywords: mesenchymal stem cells; multipotent cells; cryopreservation; cryoprotectants; dimethyl sulfoxide.

Ukrainian Neurosurgical Journal. 2017;(1):5-10.

Современные подходы к кріоконсервированию клеток мезенхімального происхожденияМаслова О.А.¹, Дерябіна Е.Г.¹, Пічкур Л.Д.², Вербовская С.А.², Акінола С.Т.²¹ Отдел генных технологий, Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев, Украина² Отделение восстановительной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, УкраинаПоступила в редакцию 12.12.16.
Принята к публикации 27.12.16.**Адрес для переписки:**Пічкур Леонід Дмитрієвич,
Отделение восстановительной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова, ул. Платона Майбороды, 32, Киев, Украина, 04050, e-mail: wurra@yandex.ru

Проблема лечения воспалительно-дегенеративных заболеваний ЦНС человека актуальна. Прогресс в лечении таких заболеваний связывают с развитием клеточных технологий. Одними из наиболее перспективных для использования в клинической практике являются клетки вартонового геля пуповины человека, при получении которых не возникает морально-этический конфликт, процедура их выделения достаточно проста. Исходя из перспектив клинического применения МСК пуповины человека, следует рассматривать вопросы выбора оптимального метода длительного хранения (кріоконсервирования) МСК с учетом режима замораживания, вида кріопротектора, продолжительности хранения. Проанализированы данные литературы последних лет о способах кріоконсервирования МСК, в том числе полученных из ткани пуповины человека.

Ключевые слова: мезенхімальні стовбові клітини; мультипотентні клітини; кріоконсервирование; кріопротекторы; диметилсульфоксид.

Украинский нейрохирургический журнал. — 2017. — №1. — С.5-10.

Вступ. Проблема лікування запально-дегенеративних захворювань ЦНС людини актуальна і потребує подальших новаторських рішень. Прогрес у лікуванні цих захворювань пов'язують з розвитком клітинних технологій. У теперішній час досягнуті певні успіхи у вивченні можливості впливу за допомогою клітин-прогеніторів різного походження (нейрогенні стовбурові клітини фетального мозку, гемопоетичні стовбурові клітини) на деструктивний аутоімунітет, нейротрофічні процеси. Проте, застосування цих клітин має деякі обмеження, в тому числі біоетичні [1].

Регенеративна медицина з кожним роком потребує все більшої гарантії безпечності та ефективності клітинної терапії, тому обрання оптимальних джерел клітин є одним з її ключових етапів. Сьогодні в клітинній терапії використовують різноманітні клітини (як дорослого організму, так і ембріональні), особливе місце серед яких посідають мезенхімальні стовбурові (мультипотентні стромальні) клітини (МСК). Це зумовлене, насамперед, їх імунорегуляторними властивостями, здатністю диференціюватися в декілька типів клітин, можливістю отримання великої кількості клітин за короткий час, відносно простотою культивування. Опубліковані дані про виявлення та успішне виділення МСК практично з усіх тканин організму, проте, основну увагу приділяють таким джерелам клітин, як кістковий мозок, жирова тканина, провізорні ембріональні тканини (плацента, пуповина тощо). Одними з найперспективніших для використання в клінічній практиці є клітини вартонних драглів пуповини (пупкового канатика), які, на відміну від кісткового мозку та жирової тканини, містять клітини, що збереглися з ранніх етапів ембріогенезу [2].

При отриманні клітин з пуповини не виникає морально-етичний конфлікт, процедура ізолювання МСК з пупкового канатика досить проста. В досліджах на тваринах після імуносупресії доведено, що внутрішньовенне або підшкірне введення таких клітин не спричиняє їх відторгнення або критичного негативного впливу. На звичайних тваринах без імуносупресії показано, що принаймні одноразова трансплантація ксеногенних клітин вартонних драглів пуповини можлива без їх негайного відторгнення. Дані літератури свідчать про більш виражені імуносупресивні властивості МСК пуповини у порівнянні з аналогічними клітинами з інших джерел, що, поряд з іншими перевагами, обґрунтовує перспективність їх використання в регенеративній медицині [3].

Зважаючи на перспективи клінічного застосування МСК пуповини людини, постає питання щодо вибору оптимального методу тривалого зберігання (кріоконсервування) МСК, режиму заморожування, виду кріопротектора, тривалості зберігання.

В останні роки відзначають активний розвиток технологій збереження клітин і тканин. Найчастіше для їх збереження застосовують метод кріоконсервування. Значний досвід накопичений у приватних та публічних кріобанках, де зберігають кістковий мозок, пуповинну кров, пуповину, жирову тканину, пульпу молочних зубів та інші тканини, з яких можна отримати клітини, а також безпосередньо клітинний матеріал: гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК), МСК, ендотеліальні клітини, гамети тощо [2, 4].

Існують кілька підходів до кріозбереження. Процес заморожування можна розділити за швидкістю на стрімке та повільне (у тому числі програмоване). Агентом, що забезпечує низьку температуру може бути як рідкий азот, так і його газова фаза.

Окремо слід виділити підходи до підбору кріопротектора — речовини, що забезпечує збереження властивостей клітини у незміненому вигляді протягом періоду кріоконсервації. У цьому питанні єдиної думки немає. Так, вже протягом тривалого часу для кріоконсервування клітин застосовують диметилсульфоксид (ДМСО), механізми дії якого добре вивчені. Цей кріоконсервант є стандартним і для комерційного збереження клітин, і для наукових досліджень. Проте, при застосуванні ДМСО як кріопротектора, навіть в мінімальних дозах, можливе виникнення небажаних реакцій, тому препарат не сертифікований для застосування в лікуванні пацієнтів. Це спонукало до пошуку альтернативних речовин, здатних захищати клітину від пошкодження, зумовленого наднизькою температурою, та бути безпечними для подальших маніпуляцій з клітинами, у тому числі для введення в організм пацієнта [5].

Також важливим елементом кріопротекторного розчину є джерело факторів росту або білків — сироватка, збагачена тромбоцитами плазма або альбумін. Різноманіття розчинів зумовлене великою кількістю можливих поєднань концентрації зазначених компонентів.

Проаналізовані дані літератури останніх років щодо способів кріоконсервування МСК, в тому числі отриманих з тканин пуповини людини, адже, саме це джерело МСК сьогодні визнане оптимальним.

Кріопротектори. За принципами дії розрізняють кріопротектори, що проникають крізь мембрану у клітину, та такі, що створюють певні умови навколо клітини. До першої групи належать гліцерил, пропілен гліколь, етилен гліколь, формамід, метанол, бутандіол, ДМСО [6–8]. Всі ці речовини у різні часи випробовували як кріопротектори для збереження органів, тканин і клітин. Проте, застосування кожного з проникних кріопротекторів зумовлює різні типи пошкодження клітин, що виникають в основному внаслідок руйнування мембрани клітин, підвищення рівня окисного стресу або через осмотичний шок. Є відомості про зменшення індивідуальної токсичності кожного кріопротектора за їх комбінованого застосування. Механізми такої взаємодії недостатньо вивчені [8, 9]. Наявність деяких недоліків і при застосуванні ДМСО спонукає до пошуку альтернатив. ДМСО належить до групи проникних речовин, тому забезпечує максимальне підтримання властивостей клітини, за його високої концентрації виникають побічні реакції при подальшому застосуванні розмороженого клітинного матеріалу у клініці [6–9]. Проблемою також є залежність токсичної дії ДМСО від температури. Так, за кімнатної температури ДМСО у концентрації, що застосовують під час кріоконсервування, досить швидко проявляє цитотоксичну дію, саме тому у більшості протоколів кріоконсервування для клінічного застосування рекомендують додавати кріопротектор не раніше ніж за 5–10 хв до заморожування [6–10]. До речовин, що вважають безпечнішими заміниками ДМСО, належать дисахариди (у тому числі трегалоза

та ін.). Проте, вони належать до непроникних кріопротекторів і, без участі проникного агенту, не забезпечують повний захист від утворення кристаліків льоду [6, 7]. Тому більшість дослідників схиляються до думки, що концентрація ДМСО у кріопротекторному розчині має бути знижена, і до складу такого розчину слід додавати дисахариди [6–10]. Відрізняються співвідношення кріопротектора та джерела факторів росту при збереженні вже виділених із матеріалу клітин (МСК, ГСК) та самої тканини — джерела для подальшого отримання первинної культури.

Показаний вплив ДМСО як на характеристики клітин після розмороження, так і на стан пацієнта, якому введено дозу таких клітин. Важливим аспектом ефективності МСК є здатність до імуномодуляції. У цілому здатність пригнічувати або активувати імунну відповідь після розмороження зберігається, проте, виявлені і деякі зміни, пов'язані з активацією білків теплового шоку. Важливою є і здатність до індукованого диференціювання. Цей параметр не змінюється, хоча є дані про зниження здатності до адипо- та остеогенезу МСК, отриманих з стромально-васкулярної фракції жирової тканини після розмороження. Також відзначають підвищення схильності МСК до диференціювання у напрямку кардіоміоцитів та нейронів, хоча цей феномен можна застосовувати і з користю. Життєздатність клітин максимальна саме при застосуванні ДМСО у порівнянні з іншими кріопротекторами: ДМСО — понад 80%, гліцерилу — 70–80%, трегалози — 30–40%, цукрози — 20–30%. Здатність до експресії поверхневих маркерів та морфологічні особливості МСК після розмороження змінюються, проте, існує загроза нестабільності хромосом після застосування ДМСО [6–13]. Функціонально яскравим показником ефективності МСК слід вважати здатність до хоумінгу. Досліджень з вивчення цього аспекту небагато, проте, в деяких з них стверджується про зменшення здатності до хоумінгу внаслідок змін взаємодії з деякими елементами позаклітинного матриксу. З побічних реакцій, частота яких становить близько 50% у тварин та людини після введення кріозбережених з використанням ДМСО МСК, найбільш часті: нудота, блювання, діарея, біль у животі, головний біль, зниження та підвищення артеріального тиску. Значно рідше, проте, задокументовані й більш серйозні стани, спричинені порушеннями серцево-судинної та дихальної систем: аритмія, пригнічення дихання, фатальне порушення ритму серця, обернена лейкоенцефалопатія та навіть інсульт. Описана смерть пацієнта після введення другої дози кріоконсервованих з ДМСО МСК, введених у строки до 24 год після першої інфузії [6–8]. В літературі є повідомлення і про спричинене ДМСО вивільнення гістаміну, активацію каспаз під час розмороження клітин [6–8].

З альтернативних речовин, що застосовують для того, щоб повністю позбутися ДМСО або хоча б значно зменшити його концентрацію у середовищі для кріозбереження, описують поєднане використання непроникних кріопротекторів, найчастіше — сахарів, зокрема, гідроксиетилкрахмалу з сорбітолом та декстраном. Цікаво, що поодиночі ці компоненти не проявляли достатнього захисного впливу на клітини, також не впливали на ефект при застосуванні у поєднанні кожної речовини з ДМСО [14].

За даними досліджень, багатокомпонентні кріопротектори більш безпечні [6, 14–18].

Привертають увагу і методи, що поєднують застосування хімічного кріопротектора — трегалози та фізичного впливу — електропорації, що надає можливість трегалозі потрапити у клітину. Саме такий підхід забезпечує найбільш ефективне тривале кріозберігання клітин тканини пуповини людини [15, 16].

Крім безпосередньо кріопротектора, середовище для кріозбереження клітин містить й інші складові. Важливим компонентом середовища для кріозбереження є джерело білкового компоненту (факторів росту). Найчастіше застосовують фетальну бичачу сироватку (ФБС), яку використовують для культивування МСК. Проте, загальна тенденція до уникнення застосування ксеногенних елементів під час підготовки клітин до введення пацієнтам привела до пошуку альтернатив ФБС. Серед них найчастіше застосовують аутологічну та алогенну сироватку, збагачену тромбоцитами плазму, альбумін, комерційні "xeno-free" розробки, призначені спеціально для роботи у gmp-умовах [3–8, 18].

Стандартним для лабораторних маніпуляцій з клітинами є співвідношення компонентів кріозахисного розчину: 10% ДМСО та 90% ФБС. Є протоколи з більшою або меншою концентрацією ДМСО, а також з заміною відповідної частини ФБС на поживне середовище. За такої ситуації отримують різні варіанти сумішей, зокрема, 5% ДМСО поєднують з 75% ФБС та 20% середовища ДМЕМ, або 25% ДМСО додають до 75% ФБС тощо [3, 4, 12].

Останнім часом вивчають і більш «екзотичні» компоненти середовища для кріозбереження — білки гемолімфи шовкопряда, що поєднують заміщення функцій ФБС та можливості для значного зменшення концентрації ДМСО [19].

Практично всі автори, які досліджують вплив кріопротекторів на стан клітин та реакції організму після введення розмороженого матеріалу, наголошують на необхідності відмивання кріопротектора перед введенням клітин. У цьому плані робота з МСК дещо простіша, ніж з ГСК, адже, існує можливість перед введенням клітин в організм провести, як мінімум, 1 пасаж культивування, протягом якого клітини прикріплюються до поверхні культурального посуду та поступово позбуваються кріопротектора, що виводиться з кожною зміною середовища.

Описані і спеціальні системи для відмивання клітин від кріопротектора, якщо немає можливості або часу для культивування. Щоправда, такі системи недосконалі, процедура відмивання, як правило, супроводжується втратою частини життєздатних клітин [20].

Вимоги до рідкого азоту та кріоемностей.

У теперішній час для кріозбереження біоматеріалів застосовують два підходи: вміщення кріоемностей з клітинами у «дзеркало» рідкого азоту (-196°C) та у газову фазу рідкого азоту (близько -150°C/-160°C) [3–8]. В обох цих варіантів є переваги та недоліки. Так, збереження у рідкій фазі дозволяє зменшити шкідливий вплив наднизької температури на клітину. У той же час, рідка фаза азоту більш агресивна до матеріалів, тому слід дуже ретельно підбирати кріоемності. Додаткову небезпеку становить забруднення

рідкого азоту вірусами, мікроорганізмами та грибами, а також перехресне забруднення клітинним матеріалом, що витікає крізь мікрошпаринки недостатньо герметичних кріоємностей в азот і може потрапити в інший зразок [21]. Тому для зберігання матеріалів у «дзеркалі» рідкого азоту часто застосовують додаткові методи захисту — вміщують кріопробірки чи кріопакети у подвійні зовнішні пакети, які розташовують у металевих касетах. Формат таких ємностей та способи розташування зразків різняться залежно від будови судини Дюара. Кріозберігання у парах рідкого азоту забезпечує підтримання дещо вищої температури та характеризується її більшою лабільністю, що може спричинити додаткове пошкодження клітинного матеріалу. Проте, така форма кріозберігання більш безпечна з точки зору поширення інфекцій та перехресного забруднення, оскільки хоча інфекційні агенти і можуть зберігатися у газовій фазі, для такої форми рідкого азоту є більше надійних кріоємностей, що значно знижує ризик забруднення [9, 11, 21]. Немає визначеної позиції щодо вибору між кріопробірками та кріопакетами для збереження саме МСК.

Швидкість замороження. Існують два стратегічні підходи до кріозамороження клітин: швидке (вітрифікація) та повільне.

Вітрифікація — процес швидкого вміщення клітин у «дзеркало» рідкого азоту без перехідних етапів. Для ефективності методу клітини мають безпосередньо контактувати з рідким азотом. Цей підхід має дві варіації: така, що потребує мультимолярної концентрації кріопротектора (додають поетапно) та така, що відбувається за дещо меншої концентрації кріопротектора, проте, потребує надшвидкого зниження температури. Для різкого зниження температури застосовують спеціальні носії з скла, кварцу або пластика, що забезпечують максимальну швидкість охолодження [6, 8]. Основними недоліками вітрифікації є необхідність володіти специфічними навичками виконання процесу. Такі складні методичні підходи виправдовують себе, коли потрібно заморозити невелику кількість клітин (метод найкраще адаптований для кріоконсервування гамет), проте, вони не є адекватними для збереження значного об'єму клітин, у тому числі МСК. Також відзначають збільшення потенційної шкоди від застосування високої концентрації кріопротекторів та вірогідність виникнення осмотичного шоку [6–8]. Не вирішене також питання забруднення, адже саме при вітрифікації клітини безпосередньо контактують з рідким азотом.

Повільне заморожування — процес поетапного зниження температури зразка, часто з застосуванням спеціального обладнання. Стандартним для збереження ГСК та МСК вважають режим зниження температури на 1°C за 1 хв. Такої швидкості досягають, застосовуючи програмні заморожувачі, проте, інколи наближаються до неї за поетапного зниження температури у ручному режимі, витримуючи зразки спочатку при +4°C, а потім при -80°C [3, 7, 9, 11, 21].

Одним з основних завдань, крім пошуку оптимального кріопротектора, є розробка закритої системи, що дозволить зберігати клітини з мінімальним впливом людини та уникненням контакту з азотом. Деякі комерційні розробки доступні вже сьогодні, проте, їх масове застосування недоцільне (у зв'язку з

високими витратами на закупівлю та обслуговування таких систем) [20].

Що стосується розморожування клітин, при застосуванні апаратів для програмного заморожування в них є системи і для автоматичного повільного розморожування клітин. За відсутності таких систем застосовують водяні бані при температурі близько 37°C [7, 9].

Підходи до оцінки ефективності процесу кріозбереження. Основним показником ефективності кріозбереження вважають життєздатність клітин після розмороження. Цей показник визначають як методом забарвлення трипановим синім, так і проточною цитофлуориметрією (забарвлення 7-AAD). Деякі автори довели кількість життєздатних клітин після розмороження до 90% і більше [22–30].

Також звертають увагу на відповідність морфології клітин у культурі характеристикам МСК.

В усіх дослідженнях приділяють увагу оцінці імунотипу МСК до і після розмороження методом проточної цитофлуориметрії. Існуючі методи кріозбереження клітин дозволяють зберегти високий рівень експресії позитивних поверхневих маркерів МСК (стандартних CD73, CD90, CD105 та деяких інших, вибір яких різний у різних роботах) та низький рівень експресії (або її відсутність) негативних поверхневих маркерів МСК (CD34, CD45) [7, 23, 24].

Типовим для перевірки властивостей МСК є оцінка здатності до трилінійного диференціювання: у хондроенному, остеогенному та адипогенному напрямках. Як правило, таке індуковане диференціювання є успішним як до, так і після розмороження клітин. Оцінюють ефективність диференціювання стандартними методами: імуноцитохімічним та гістохімічним забарвленням, визначають маркери певного напрямку. Додатково оцінюють здатність до диференціювання МСК в інших напрямках [17, 22–30].

Деякі дослідники аналізують каріотип, щоб оцінити ризик виникнення аномалій хромосом під час замороження-розмороження [22–30].

Досліджено експресію певних генів до і після розмороження МСК, а також системного введення в організм дослідних тварин. При цьому порівнювали незаморожені клітини, клітини після розморожування та клітини, знайдені у легенях мишей, яким їх вводили. Досліджували експресію методом РНК-секвенування. Суттєві відмінності експресії основних маркерів не знайдені [23, 24].

Інформативним показником є вимірювання миттевої, опосередкованої кров'ю запальної реакції, що оцінюють за вмістом цитокінів та хемокінів у тканині, в яку вводили клітини. Встановлений деякий вплив на цей показник процесу замороження-розмороження [22–30].

Також проводили дослідження з визначення ризику утворення пухлин *in vivo* — вводили МСК підшкірно та системно у хвостову вену *pude* мишам. Через 6 міс спостереження тварин виводили з експерименту та оцінювали стан органів. Ще одним параметром, за яким часто оцінюють якість процесу кріозбереження, є здатність МСК до імунотипування. Так, клітини перевіряють у взаємодії з мітоген-активованими мононуклеарами периферійної крові [22–30].

У теперішній час найбільш поширені методи кріозбереження МСК, основані на застосуванні ДМСО як

кріопротектора та нексенногенного джерела факторів росту (сироватка, збагачена тромбоцитами плазма). Хоча ДМСО має недоліки та побічні ефекти, його основною перевагою є можливість найдовшого вивчення і застосування та розуміння механізмів дії як на клітинному, так і органному рівні. Проте, пошук більш безпечного кріопротектора, що забезпечить захист клітині на тому самому рівні, що й ДМСО, та буде позбавлений його недоліків, триває, адже, сьогодні не існує кріоформули, що доведено гарантувала б повноцінне збереження усіх функцій клітини та безпеку під час застосування. Чим ретельніше вивчають ефекти комбінованих кріопротекторів, тим більша вірогідність отримати максимально оптимізоване співвідношення речовин, ефекти яких будуть детально описані як на рівні культури клітин, так і на рівні реакцій організму реципієнта клітинного матеріалу. Найбільш доцільним методом підготовки до кріозберігання МСК вважають поступове зниження температури, переважно у програмному заморожувачі.

Список літератури

- Цымбалюк В.И. Нейротрансплантация как модель медицины будущего: морально-этические проблемы / В.И. Цымбалюк // Мистецтво лікування. — 2004. — №1. — С.6–11.
- Fagioli Fr. Mesenchymal stem cell manufacturing for clinical use / Fr. Fagioli, Iv. Ferrero. Progress in Stem Cell Transplantation, Chapter 7; ed. Taner Demirer. — 2015. <http://doi:10.5772/61370>
- Vangsness C.T. Umbilical cord tissue offers the greatest number of harvestable mesenchymal stem cells for research and clinical application: a literature review of different harvest sites / C.T. Vangsness, H. Sternberg, L. Harris // Arthroscopy. J. Arthroscop. Relat. Surg. — 2015. — V.31, N9. — P.1836–1843.
- Maslova O. Umbilical cord tissue-derived cells as therapeutic agents / O. Maslova, M. Novak, P. Kruzliak // Stem Cells Internat. — 2015. — V.2015. — P.1–10.
- Balci D. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking / D. Balci, A. Can // Curr. Stem Cell Res. Ther. — 2013. — V.8, N1. — P.60–72.
- Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine / W. Asghar, R. El. Assal, H. Shafiee, R.M. Anchan, U. Demirci // Biotechnol. J. — 2014. — V.9, N7. — P.895–903.
- Mantri S. Cryoprotective effect of disaccharides on cord blood stem cells with minimal use of DMSO / S. Mantri, S. Kanungo, P.C. Mohapatra // Ind. J. Hematol. Blood Transfus. — 2014. — V.31, N2. — P.206–212.
- Best B.P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions / B.P. Best // Rejuvenat. Res. — 2015. — V.18, N5. — P.422–436.
- Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges / K.W. Yong, W.K. van Safwani, F. Xu, W.A. WanAbas, J.R. Choi, B. Pingguan-Murphy // Biopreservation and biobanking. — 2015. — V.13, N4. — P.231–239.
- Cryoprotective agent toxicity interactions in human articular chondrocytes / K.A. Almansoori, V. Prasad, J.F. Forbes, G.K. Law, L.E. McGann, J.A. Elliott, N.M. Jomha // Cryobiology. — 2012. — V.64, N3. — P.185–191.
- Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: current technologies and challenges / A.C. Schnitzler, A. Verma, D.E. Kehoe, D. Jing, J.R. Murrell, K.A. Der, M. Aysola, P.J. Rapiejko, S. Punreddy, M.S. Rook // Biochem. Engin. J. — 2016. — V.108. — P.3–13.
- Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank / T.K. Chatzistamatiou, A.C. Papassavas, E. Michalopoulos, C. Gamaloutsos, P. Mallis, I. Gontika, E. Panagouli, S.L. Koussoulakos, C. Stavropoulos-Giokas // Transfusion. — 2014. — V.54, N12. — P.3108–3120.
- The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues / O.G. Davies, A.J. Smith, P.R. Cooper, R.M. Shelton, B.A. Scheven // Cryobiology. — 2014. — V.69, N2. — P.342–347.
- Naaldijk Y. Cryopreservation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in complex sugar based cryoprotective solutions / Y. Naaldijk, V. Fedorova, A. Stolzing // J. Biotechnol. Letters. — 2013. — V.4, N.2. — P.95–99.
- Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line / S.S. Buchanan, S.A. Gross, J.P. Acker, M. Toner, J.F. Carpenter, D.W. Pyatt // Stem Cells Development. — 2004. — V.13, N3. — P.295–305.
- Cryopreservation of human umbilical stem cells in combination with trehalose and reversible electroporation / B. Dovgan, J. Dermol, A. Barlič, M. Knežević, D. Miklavčič // 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies (Portoroz, Slovenia, 06/09/2015). — Singapore: Springer, 2016. — P.307–310.
- Safe and effective cryopreservation methods for long-term storage of human-amniotic-fluid-derived stem cells / A. Hennes, L. Gucciardo, S. Zia, F. Lesage, N. Lefèvre, L. Lewi, A. Vorrsselmans, T. Cos, R. Lories, J. Deprest, J. Toelen // Prenat. Diagn. — 2015. — V.35, N5. — P.456–462.
- Defined serum- and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells / S.H. Al-Saqi, M. Saliem, H.C. Quezada, A. Ekblad, A.F. Jonasson, O. Hovatta, C. Götherström // Cell Tissue Banking. — 2015. — V.16, N2. — P.181–193.
- Efficient cryopreservation of human mesenchymal stem cells using silk worm hemolymph-derived proteins [Електронний ресурс] / S-M. Kim, C-K. Yun, J-H. Park, J.W. Hwang, Z-H. Kim, Y-S. Choi // J. Tissue Engin. Regener. Med. — 2016.
- A cryopreservation system for direct clinical use of MSC / S. Thirumala, E. Fearnot, W.S. Goebel, E.J. Woods // Cytotherapy. — 2013. — V.15, N4. — P.46–47.
- Thirumala S. Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. / S. Thirumala, W.S. Goebel, E.J. Woods // Expert Opin. Biol. Ther. — 2013. — V.13, N5. — P.673–691.
- A new standardized clinical-grade protocol for banking human umbilical cord tissue cells / R. Fazzina, A. Mariotti, A. Procoli, D. Fioravanti, P. Iudicone, G. Scambia, L. Pierelli, G. Bonanno // Transfusion. — 2015. — V.55, N12. — P.2864–2873.
- Cryopreservation effects on Wharton's jelly stem cells proteome / F. di Giuseppe, L. Pierdomenico, E. Eleuterio, M. Sulpizio, P. Lanuti, A. Riviello, G. Bologna, M. Gesi, C. Di Ilio, S. Miscia, M. Marchisio, S. Angelucci // Stem Cell Rev. — 2014. — V.10, N3. — P.429–446.
- Post-cryopreservation viability of mesenchymal stem cells / A. van Campenhout, L. Swinnen, J. Klykens, T. Devos, G. Verhoef // Cytotherapy. — 2014. — V.16, N4. — P.83.
- Effects of freeze-thawing and intravenous infusion on mesenchymal stromal cell gene expression / M.J. Hoogduijn, S.F. de Witte, F. Luk, M.C. vanden Hout-van Vroonhoven, L. Ignatowicz, R. Catar, T. Strini, S.S. Korevaar, W.F. van IJcken, M.G. Betjes, M. Franquesa // Stem Cells Dev. — 2016. — V.25, N8. — P.586–597.
- Clinical mesenchymal stromal cell products undergo functional changes in response to freezing / K. Pollock, D. Sumstad, D. Kadidlo, D.H. McKenna, A. Hubel // Cytotherapy. — 2015. — V.17, N1. — P.38–45.
- Isolation of multipotent mesenchymal stroma cells from cryopreserved human umbilical cord tissue / Y.A. Romanov, E.E. Balashova, N.E. Volgina, N.V. Kabaeva, T.N. Dugina, G.T. Sukhikh // Bull. Experim. Biol. Med. — 2016. — V.160, N4. — P.530–534.
- Serum- and xeno-free cryopreservation of human umbilical cord tissue as mesenchymal stromal cell source / T. Shimazu, Y. Mori, A. Takahashi, H. Tsunoda, A. Tojo, T. Nagamura-Inoue // Cytotherapy. — 2015. — V.17, N5. — P.593–600.
- Effects of cryoprotectants on freezing, culture behaviour of buffalo umbilical cord matrix cells / P. Singh, M.K. Rose, P.S. Yadav, R. Sharma, J. Singh // J. Cell Tissue Res. — 2013. — V.13, N2. — P.3625–3630.

30. Mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord and adipose tissue retain their properties after 24 months of cryopreservation / C.Y. Wong, G.C. Ooi, W.P. Vivian Kong, M.F. Chai, K. Thiagarajah, K.Y. Then, S. Cheong // *Cytotherapy*. — 2015. — V.17, N6. — P.37–38.

References

1. Tsymbaluk VI. [Neurotransplantation as a model for the future of medicine: ethical issues]. *Mystetstvo likuvannya*. 2004;(1):6-11. Ukrainian.
2. Fagioli F, Ferrero I. Mesenchymal stem cell manufacturing for clinical use. In: Taner Demirer, ed. *Progress in Stem Cell Transplantation*. 2015. doi:10.5772/61370.
3. Vangsnest CT, Sternberg H, Harris L. Umbilical cord tissue offers the greatest number of harvestable mesenchymal stem cells for research and clinical application: a literature review of different harvest sites. *Arthroscopy: J Arthroscop Relat Surg*. 2015;31(9):1836-43. doi:10.1016/j.arthro.2015.03.014. PMID:26354202.
4. Maslova O, Novak M, Kruzliak P. Umbilical cord tissue-derived cells as therapeutic agents. *Stem Cells International*. 2015;2015:1-10. doi:10.1155/2015/150609. PMID:26246808.
5. Balci D, Can A. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013;8(1):60-72. doi:10.2174/1574888x11308010008. PMID:23270628.
6. Asghar W, ElAssal R, Shafiee H, Anchan RM, Demirci U. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnol J*. 2014;9(7):895-903. doi:10.1002/biot.201300074. PMID:24995723.
7. Mantri S, Kanungo S, Mohapatra PC. Cryoprotective effect of disaccharides on cord blood stem cells with minimal use of DMSO. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015;31(2):206-12. doi:10.1007/s12288-014-0352-x. PMID:25825559.
8. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res*. 2015;18(5):422-36. doi:10.1089/rej.2014.1656. PMID:25826677.
9. Yong KW, WanSafwani WK, Xu F, WanAbas WA, Choi JR, Pinguun-Murphy B. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges. *Biopreservation and biobanking*. 2015;13(4):231-9. doi:10.1089/bio.2014.0104. PMID:26280501.
10. Almansoori KA, Prasad V, Forbes JF, Law GK, McGann LE, Elliott JA, Jomha NM. Cryoprotective agent toxicity interactions in human articular chondrocytes. *Cryobiology*. 2012;64(3):185-91. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.01.006. PMID:22274740.
11. Schnitzler AC, Verma A, Kehoe DE, Jing D, Murrell JR, Der KA, Aysola M, Rapiejko PJ, Punreddy S, Rook MS. Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: current technologies and challenges. *Biochemical Engineering Journal*. 2016;108:3-13. doi:10.1016/j.bej.2015.08.014.
12. Chatzistamatiou TK, Papassavas AC, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, Gontika I, Panagouli E, Koussoulakos SL, Stavropoulos-Giokas C. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*. 2014;54(12):3108-20. doi:10.1111/trf.12743. PMID:24894363.
13. Davies OG, Smith AJ, Cooper PR, Shelton RM, Scheven BA. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology*. 2014;69(2):342-7. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.08.003. PMID:25127874.
14. Naaldijk Y, Fedorova V, Stolzing A. Cryopreservation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in complex sugar based cryoprotective solutions. *Journal of Biotechnology Letters*. 2013;4(2):95-9.
15. Buchanan SS, Gross SA, Acker JP, Toner M, Carpenter JF, Pyatt DW. Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem cells and development*. 2004;13(3):295-305. doi:10.1089/154732804323099226. PMID:15186725.
16. Dogan B, Dermol J, Barlič A, Knežević M, Miklavčič D. Cryopreservation of Human Umbilical Stem Cells in Combination with Trehalose and Reversible Electroporation. *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies 2016* (pp.307-310). Singapore: Springer. doi:10.1007/978-981-287-817-5_68.
17. Hennes A, Gucciardo L, Zia S, Lesage F, Lefèvre N, Lewi L, Vorselemans A, Cos T, Lories R, Deprest J, Toelen J. Safe and effective cryopreservation methods for long-term storage of human-amniotic-fluid-derived stem cells. *Prenatal diagnosis*. 2015;35(5):456-62. doi:10.1002/pd.4556. PMID:25641322.
18. Al-Saqi SH, Saliem M, Quezada HC, Ekblad A, Jonasson AF, Hovatta O, Götherström C. Defined serum- and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells. *Cell and tissue banking*. 2015;16(2):181-93. doi:10.1007/s10561-014-9463-8. PMID:25117730.
19. Kim S-M, Yun C-K, Park J-H, Hwang JW, Kim Z-H, Choi Y-S. Efficient cryopreservation of human mesenchymal stem cells using silkworm hemolymph-derived proteins. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016. doi:10.1002/term.2116.
20. Thirumala S, Fearnot E, Goebel WS, Woods EJ. A cryopreservation system for direct clinical use of MSC. *Cytotherapy*. 2013;15(4):46-7. doi:10.1016/j.jcyt.2013.01.177.
21. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. *Expert opinion on biological therapy*. 2013;13(5):673-91. doi:10.1517/14712598.2013.763925.
22. Fazzina R, Mariotti A, Procoli A, Fioravanti D, Iudicone P, Scambia G, Pierelli L, Bonanno G. A new standardized clinical grade protocol for banking human umbilical cord tissue cells. *Transfusion*. 2015;55(12):2864-73. doi:10.1111/trf.13277. PMID:26354088.
23. Di Giuseppe F1, Pierdomenico L, Eleuterio E, Sulpizio M, Lanuti P, Riviello A, Bologna G, Gesi M, Di Ilio C, Miscia S, Marchisio M, Angelucci S. Cryopreservation effects on Wharton's jelly stem cells proteome. *Stem Cell Rev*. 2014;10(3):429-46. doi:10.1007/s12015-014-9501-8. PMID:24619862.
24. Van Campenhout A, Swinnen L, Klykens J, Devos T, Verhoef G. Post-cryopreservation viability of mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2014;16(4):S83. doi:10.1016/j.jcyt.2014.01.301.
25. Hoogduijn MJ, deWitte SF, Luk F, vanden Hout-van Vroonhoven MC, Ignatowicz L, Catar R, Strini T, Korevaar SS, van IJcken WF, Betjes MG, Franquesa M. Effects of freeze-thawing and intravenous infusion on mesenchymal stromal cell gene expression. *Stem Cells Dev*. 2016;25(8):586-97. doi:10.1089/scd.2015.0329. PMID:26914168.
26. Pollock K, Sumstad D, Kadidlo D, McKenna DH, Hubel A. Clinical mesenchymal stromal cell products undergo functional changes in response to freezing. *Cytotherapy*. 2015;17(1):38-45. doi:10.1016/j.jcyt.2014.06.008. PMID:25457275.
27. Romanov YA, Balashova EE, Volgina NE, Kabaeva NV, Dugina TN, Sukhikh GT. Isolation of multipotent mesenchymal stroma cells from cryopreserved human umbilical cord tissue. *Bull Exp Biol Med*. 2016;160(4):530-4. doi:10.1007/s10517-016-3213-9. PMID:26902359.
28. Shimazu T, Mori Y, Takahashi A, Tsunoda H, Tojo A, Nagamura-Inoue T. Serum-and xeno-free cryopreservation of human umbilical cord tissue as mesenchymal stromal cell source. *Cytotherapy*. 2015;17(5):593-600. doi:10.1016/j.jcyt.2015.03.604. PMID:25881518.
29. Singh P, Rose MK, Yadav PS, Sharma R, Singh J. Effects of cryoprotectants on freezing, culture behaviour of buffalo umbilical cord matrix cells. *Journal of Cell and Tissue Research*. 2013;13(2):3625-30.
30. Wong CY, Ooi GC, Vivian Kong WP, Chai MF, Thiagarajah K, Then KY, Cheong S. Mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord and adipose tissue retain their properties after 24 months of cryopreservation. *Cytotherapy*. 2015;17(6):37–8. doi:10.1016/j.jcyt.2015.03.430.