

## Криоконсервация тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины

И.В. Арутюнян<sup>1</sup>, Т.К. Дубовая<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Трансплантация искусственно созданных тканей и органов становится частью нашей реальности. При этом исследователи вполне закономерно сталкиваются с общей для всех трансплантологов проблемой – необходимостью длительного хранения биомедицинского продукта (трансплантата) без потери его свойств. Принципиальная возможность криоконсервации клеток, адгезированных на поверхности различных носителей, была впервые показана около 20 лет назад, однако данные о технологии в целом до сих пор остаются несистематизированными и противоречивыми. Сравнение работ разных научных групп, занимающихся криоконсервацией тканеинженерных конструкций (ТИК), затруднено не только вследствие отсутствия стандартизованных протоколов, но и из-за различных подходов к оценке конечного результата. Целью настоящего обзора является анализ накопленного разными научными группами опыта криоконсервации ТИК с точки зрения разработки единых подходов к оценке эффективности метода, которые необходимы для дальнейшего развития данного направления регенеративной медицины. По мере накопления экспериментальных данных произошел принципиальный переход в оценке эффективности криоконсервации от выполнения минимальных требований к сохранности ТИК (ТИК после размораживания сохранила целостность, некоторая часть клеток жива и прикреплена к матриксу) к нацеленности на конечный результат (ТИК после размораживания сохранила свои функциональные свойства и готова к трансплантации). Множество используемых в настоящее время *in vitro* методов исследования, представленных в обзоре, позволяет искать новые пути повышения эффективности криоконсервации ТИК, однако, по нашему мнению, следующим этапом на пути внедрения технологии в клиническую практику должны стать исследования на экспериментальных животных.

**Ключевые слова:** тканеинженерная конструкция, криоконсервация, оценка эффективности

**Для корреспонденции:** Ирина Владимировна Арутюнян. E-mail: labrosta@yandex.ru

**Для цитирования:** Арутюнян И.В., Дубовая Т.К. Криоконсервация тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины. Клини. экп. морфология. 2021;10(2):6–12. DOI: 10.31088/СЕМ2021.10.2.6-12.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 20-02-00354.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 16.12.2020. Получена после рецензирования 20.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

## Cryopreservation of tissue-engineered constructs in regenerative medicine

I.V. Arutyunyan<sup>1</sup>, T.K. Dubovaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The transplantation of artificial tissues and organs is gradually becoming a part of our reality. At the same time, researchers are facing a problem common to all transplantologists, i.e. the need for a long-term storage of a biomedical product (transplant) without losing its properties. The possibility to cryopreserve cells adhered to various scaffolds' surface was first presented about 20 years ago. However, the data on the technology as a whole remains unsystematized and controversial. This review aimed to analyze the literature on tissue-engineered constructs (TEC) cryopreservation of different scientific groups to create a unified approach in assessing the technique's efficacy necessary for further regenerative medicine development. The comparison

of studies on TEC cryopreservation conducted by various research groups is hampered not only by the lack of standardized protocols but also by different approaches to assessing the result. As experimental data were accumulated, the cryopreservation efficacy was reassessed from meeting the basic requirements for the structure preservation (thawed TEC retains its integrity, cells are partially alive and attached to the matrix) to focusing on the final result (thawed TEC retains its functional properties and is ready to be transplanted). Many of the currently used *in vitro* research methods presented in the review allow one to look for new ways of increasing the TEC cryopreservation efficacy; however, in our opinion, the next step on the way to introducing the technology into clinical practice should be research on experimental animals.

**Keywords:** tissue engineered construction, cryopreservation, efficacy estimation

**Corresponding author:** Irina V. Arutyunyan. E-mail: labrosta@yandex.ru

**For citation:** Arutyunyan I.V., Dubovaya T.K. Cryopreservation of tissue-engineered constructs in regenerative medicine. Clin. exp. morphology. 2021;10(2):6–12. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.6-12 (In Russ.).

**Funding.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 20-02-00354.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 16.12.2020. **Received in revised form** 20.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

## Введение

Мы живем в удивительное с точки зрения возможностей регенеративной медицины время: уже сейчас биотехнологи способны создавать в научных лабораториях эквиваленты кожи [1], хряща [2], костной [3], мышечной [4] и других тканей или целых органов [5, 6], состоящие из живых клеток и искусственного внеклеточного матрикса, которому можно задать конкретные физико-механические свойства. Аналитики говорят о наступлении новой эры в развитии тканевой инженерии, когда на первое место ставится не решение экспериментальной научной задачи, а конкретные потребности пациента, которые можно удовлетворить за счет трансплантации стандартизованного высокотехнологичного медицинского продукта [7].

Одной из причин, тормозящих развитие этой области медицины, являются высокие материальные и временные затраты на создание тканеинженерных конструкций (ТИК) и их доставку из специализированных лабораторий к пациенту. Персонализированные варианты имплантатов требуют проведения забора биоматериала у пациента, выделения, наращивания и характеристики аутогенных клеток, заселения матрикса-носителя, что может занимать до нескольких месяцев работы высококвалифицированных специалистов. В то же время при определенных состояниях реципиента (получившего, например, обширную травму кожи или другого органа) время, прошедшее от повреждения до трансплантации, играет решающую роль. В таких случаях допустимо применение ТИК с охарактеризованными донорскими (аллогенными) клетками, при этом оптимальным является использование биомедицинского продукта с продолжительным сроком годности (в англоязычной литературе – long shelf-life). Увеличение сроков хранения и возможность транспортировки ТИК к пациенту считаются необходимым условием коммерциализации данной области медицины, а следовательно, и ее дальнейшего развития [8].

В процессе подготовки ТИК возникает несколько возможностей для сохранения (в англоязычной литературе – preservation opportunities) [9], одна из которых –

криоконсервация готовой конструкции. Первые успешные работы в этом направлении были проведены около 20 лет назад, число публикаций по данной тематике растет, однако общее представление о возможностях метода до сих пор не сложилось. В первую очередь это связано с огромным разнообразием объектов исследования: научные группы работают с ТИК, отличающимися по клеточному составу (клеточные линии и первичные культуры, выделенные из разных тканей человека и животных), химическому составу и структуре скаффолда (матрикса-носителя), протоколам культивирования и криоконсервации. Больше того, не существует общепринятой методики оценки конечного результата, которая бы позволила сравнить эффективность этих протоколов. Если проанализировать работы по данной теме в историческом разрезе, становится очевидно, что сейчас уже недостаточно тех двух показателей – оценки доли выживших клеток и доли адгезированных клеток, – которыми пользовались исследователи в самом начале пути. Современные работы опираются не на формальный подход (ТИК после размораживания сохранила структуру, часть клеток жива и прикреплена к матриксу), а на конечный результат (ТИК после размораживания сохранила свои функциональные свойства и готова к трансплантации).

Целью настоящего обзора является анализ накопленного разными научными группами опыта криоконсервации ТИК с точки зрения разработки единых подходов к оценке эффективности метода, которые необходимы для дальнейшего развития данного направления регенеративной медицины.

## Особенности криоконсервации ТИК

Криоконсервацию суспензий клеток, фрагментов тканей или даже целых органов в настоящее время можно считать рутинной процедурой: во всем мире успешно функционирует множество специализированных криобанков, которые в соответствии с отработанными протоколами обеспечивают безопасное хранение миллионов биообразцов с целью их дальнейшего экспериментального или клинического применения [10].

В то же время криоконсервация ТИК пока находится на стадии активного исследования, поэтому стандартизованных протоколов нет и хранение обеспечивают не криобанки, а научно-исследовательские лаборатории. Связано это с тем, что в отличие от клеток и тканей продукт хранения необходимо сначала создать (ориентируясь на решение конкретной клинической задачи) и охарактеризовать, что требует скоординированной работы клиницистов и специалистов в области производства биоматериалов и тканевой инженерии.

Принято считать, что ТИК состоит из трех основных компонентов – скаффолда, биологически активного компонента (факторы роста, цитокины и т.д.), зачастую импрегнированного в скаффолд, и клеточного компонента [6, 9]. Тем не менее во всех работах, опубликованных к настоящему времени, исследуется криоконсервация ТИК без включения биологически активных компонентов, то есть состоящих только из скаффолда и клеток. Такое упрощение, на наш взгляд, допустимо в начале исследовательского пути, но обязательно должно быть устранено в будущем.

Наиболее явное отличие ТИК по сравнению с суспензией клеток/кластеров клеток – их размер: объем отдельной единицы замораживаемого объекта варьирует в пределах от 0,05 мм<sup>3</sup> для ТИК на основе микросфер [11] до 150 мм<sup>3</sup> для ТИК на основе пористых носителей [12], в то время как для клеточных суспензий данный параметр не превышает 0,015 мм<sup>3</sup> (примерный объем одного островка Лангерганса). Какие особенности процесса криоконсервации ТИК из этого следуют? Во-первых, крупный размер образца приводит к тому, что криопротекторная среда неравномерно распределена в его толще: адгезированные в глубине клетки не в полной мере защищены от криоповреждения вследствие низкой концентрации протектора, а клетки на поверхности могут быть подвергнуты токсическому действию криопротектора, особенно при использовании его высоких концентраций при витрификации. Во-вторых, для крупных объектов намного сложнее достигнуть требуемой для успешной криоконсервации оптимальной скорости охлаждения и нагревания. В-третьих, такой температурный градиент может привести к изменению линейных размеров скаффолда (неравномерное расширение или сжатие), что негативно скажется на адгезии клеток. И наконец, крупные размеры ТИК требуют поиска новых прикладных решений для создания стандартизованного протокола криоконсервации (подбор криопосуды, удаление криопротектора из всего объема скаффолда и т.д.). Однако мы уверены, что перечисленные трудности вполне решаемы на современном уровне развития криотехнологии, хотя и требуют тщательного анализа и отработки протоколов.

### **Накопленный опыт и нерешенные вопросы криоконсервации ТИК**

На сегодняшний день опубликовано достаточно много работ по криоконсервации ТИК, большинство из

которых посвящено решению поставленных клиницистами конкретных задач – созданию и длительному хранению искусственных эквивалентов дермы, костной и хрящевой ткани. При этом многообразие предложенных экспериментальными лабораториями конструкций огромно. К примеру, в качестве клеточного компонента могут быть использованы как иммортализованные линии (мышинные миобласты C2C12 [13], мышинные фибробласты NIH/3T3 [14], человеческие остеобластоподобные клетки остеосаркомы SaOS-2 [11] и т.д.), так и первичные культуры клеток (остеобласты кролика [11], хондроциты телят [15], мультипотентные стромальные клетки (МСК) человека, выделенные из костного мозга [16], жировой ткани [12], пуповины [17], синовиальной жидкости [18]). В качестве скаффолда применяют материалы на основе полиуретана и полистирола [13], поликапролактона [19, 20], полилактида [15], полилактогликолида [11], гидроксипапатита [21], фиброина шелка [17], коллагена [12], альгината и хитозана [16], обогащенной тромбоцитами плазмы крови [18], а также децеллюляризованную ткань, например пищевод крысы [22] или частично деминерализованный свиной костный матрикс [23]. Носители могут быть изготовлены в форме нетканого волокнистого материала [13, 17, 20], монолитных [12] и пористых матриксов [12, 14, 15, 21, 23], тонких пленок [11], гидрогелей [18] и микросфер [11, 16]. В зависимости от вида носителя используют различные методы его заселения клетками: статичный [11–13, 17, 19–21, 23], динамический [15, 16], метод погружения при полимеризации геля [18] или при центрифугировании [14], а также множественные инъекции суспензии клеток в ткань [22].

Помимо перечисленных выше параметров (тип клеток, химический состав и структура скаффолда, способ соединения компонентов) отличаются и протоколы культивирования (длительность роста клеток на матриксе до замораживания, использование ростовой или дифференцировочных сред), а также протоколы криоконсервации (контролируемое медленное охлаждение или витрификация, состав криозащитных сред, длительность хранения до размораживания).

Такое многообразие объектов и методов исследования должно в конечном счете помочь ответить на, казалось бы, простые, но важные для дальнейшего развития данного направления биотехнологии вопросы. Какой протокол замораживания выбрать? Какой криопротекторный раствор менее токсичен? Как максимально полно удалить его из ТИК перед трансплантацией? Когда нужно индуцировать дифференцировку клеток в составе ТИК: до замораживания или после? Как влияет на эффективность криоконсервации архитектура скаффолда (например, геометрия волокон нетканого матрикса или размер пор у вспененных скаффолдов)? Будет ли получившийся биомедицинский продукт (ТИК после размораживания) безопасным и эффективным? Понятно, что каждое опубликованное на данный мо-

мент исследование дает ответы на эти вопросы только в отношении какой-то конкретной ТИК, однако по мере накопления данных в будущем можно будет сделать обобщающие выводы и разработать на их основе методические рекомендации.

### Оценка эффективности криоконсервации ТИК

Сравнение работ разных научных групп, занимающихся криоконсервацией ТИК, затруднено не только вследствие отсутствия стандартизованных протоколов, но и из-за различных подходов к оценке конечного результата.

Если проанализировать публикации, можно заметить, что в самом начале исследовательского пути было достаточно подтверждения минимальной сохранности ТИК: (1) матрикс не изменил свои основные физические свойства, (2) часть клеток жива, (3) часть клеток адгезирована на матриксе. Для качественной оценки состояния ТИК после размораживания обычно применяют сканирующую электронную микроскопию [11, 13, 16, 17, 19, 20, 23] или флуоресцентную микроскопию после окрашивания клеток кальцеином АМ и бромидом этидия (или иными маркерами клеток с поврежденной мембраной) [12, 16, 18, 20, 21, 23], а для количественной оценки – метод прямого подсчета клеток с помощью цитометра (при этом можно использовать окрашивание трипановым синим для выявления погибших клеток). Применившие данный метод в своей работе Miyoshi et al. предложили ввести следующие количественные параметры: (1) эффективность иммобилизации (англ. immobilization efficiency), оцениваемая как отношение количества живых клеток, заселивших ТИК, к количеству живых клеток, использованных для заселения; (2) эффективность восстановления (англ. recovery rate), оцениваемая как отношение количества живых клеток после криоконсервации к количеству живых клеток до криоконсервации; (3) общая эффективность (англ. overall efficiency), оцениваемая как отношение количества живых клеток в составе ТИК после размораживания к количеству живых клеток, использованных для заселения [14].

Также для определения долей живых/погибших клеток удобен метод проточной цитометрии с применением красителей, связывающихся с нуклеиновыми кислотами или белками (например, иодидом пропидия, 7-AAD и т.д.), которые отличают живые клетки от погибших по степени целостности мембраны [17], однако для данного способа необходимо предварительное открепление всех клеток от скаффолда, что может быть затруднено в случае использования объемных носителей. Больше того, длительное воздействие диссоциирующих ферментов может повлиять на экспрессию поверхностных антигенов или даже вызвать гибель клеток, поэтому для выделения клеточной суспензии из готовой конструкции, как и из нативной ткани, рекомендуется использовать более мягкие коммерческие коктейли аккутазу или TrypLE [24].

При необходимости оценить жизнеспособность клеток, не открепляя их от матрикса, исследователи в более ранних работах проводили колориметрический МТТ-тест (этот метод стал золотым стандартом для определения жизнеспособности и пролиферативной активности клеток почти сразу после своего появления в 1980-х годах [25]) или его аналоги (ХТТ, МТС, ССК, WST и т.д.), также основанные на способности ферментов живых клеток восстанавливать соли тетразолия до формазановых красителей, но при этом более удобные в работе и обладающие большей чувствительностью и меньшей цитотоксичностью [11, 18, 19, 26]. Похожий принцип действия лежит в основе Alamar Blue-теста, в процессе которого живые клетки восстанавливают синий краситель резазурин до красного флуоресцирующего резорурфина, что позволяет применять для оценки результата ридеры в режиме абсорбции или флуоресценции [15, 20].

Действительно, это простые, доступные и релевантные методы, которые отлично подходят для оценки жизнеспособности культур, растущих на стандартной культуральной подложке, однако для клеток, адгезированных на 3D скаффолде, их нельзя назвать оптимальными. Дело в том, что структура скаффолда может влиять на биодоступность реактивов для клеток, расположенных в глубине носителя, а сам краситель – взаимодействовать с материалом скаффолда (например, коллагеном) [27]; следовательно, сравнение жизнеспособности клеток, адгезированных на различных по своей структуре или составу матриксах, будет некорректным. Больше того, все перечисленные методы основаны на ферментативной конверсии субстрата, а значит, на результат могут повлиять многие факторы, в том числе нарушения энергетического обеспечения клеток, изменения активности ферментов, процессов эндо-/экзоцитоза и внутриклеточного транспорта [28]. Очевидно, что воздействие криопротекторов и сверхнизких температур является стрессом для клеток, при этом последствия такого воздействия нельзя однозначно предсказать: к примеру, преинкубация гепатоцитов человека в охлажденной до +4°C среде, содержащей 1% ДМСО, в течение 90 минут перед замораживанием не повлияла на выживаемость клеток и их адгезивные свойства после размораживания, но значимо увеличила показатели МТТ-теста (на 29,7% по сравнению с контролем,  $p < 0,01$ ) [29]. Таким образом, чтобы избежать неверной интерпретации результатов, подобные тесты следует использовать для определения метаболической активности клеток (англ. cell metabolic activity) ТИК после размораживания (как это делается в более современных работах [13, 16, 17]), а для оценки жизнеспособности клеток (англ. cell viability) релевантными можно считать не зависящие от активности ферментов тесты, например окрашивание нейтральным красным (метод основан на способности живых клеток накапливать этот слабый катионный краситель в лизосомах) или сульфородамино В (метод основан на способ-

ности красителя стехиометрически связываться с белками) [26, 30, 31].

По поводу оценки клеточной жизнеспособности или метаболической активности можно сделать еще одно важное замечание: нет каких-либо строгих временных рамок для проведения данных исследований, то есть время, прошедшее от размораживания ТИК до первого измерения, может варьировать от 0 часов (сразу после размораживания) [13] до 24 часов [11, 20] или даже нескольких суток [17]. На наш взгляд, измерение данных показателей в динамике более информативно, так как позволяет оценить время, требуемое для восстановления исходных свойств ТИК. Так, например, было показано, что сразу после размораживания суммарная метаболическая активность C2C12 миобластов, адгезированных на полиуретановом или полистироловом скаффолде, составляет около 40% от исходных показателей (ТИК до замораживания), а через 24 часа возрастает до 80% [13].

Динамика восстановления свойств ТИК после размораживания имеет огромное значение: именно это определяет принципиальный переход в оценке эффективности криоконсервации от выполнения минимальных условий (ТИК после размораживания сохранила целостность, некоторая часть клеток жива и прикреплена к матриксу) к нацеленности на конечный результат (ТИК после размораживания сохранила свои функциональные свойства и готова к трансплантации). Для оценки функциональных свойств ТИК после процедуры замораживания/оттаивания в современных работах проводят дополнительные исследования, которые можно разделить на несколько групп.

1. Подтверждение сохранности физико-механических свойств скаффолда. В качестве примера можно привести измерение предела прочности на разрыв и процента относительного удлинения [17], оценку пористости образца и шероховатости его поверхности, проведение механического теста на сжатие [19]. Необходимость данных исследований обусловлена тем, что проникающие криопротекторы потенциально способны влиять на материал скаффолда, так как многие из них (ДМСО, формамид, этиленгликоль) являются полярными органическими растворителями и могут при определенных условиях стимулировать деградацию полимера или вызывать изменения морфологии поверхности [32, 33].

2. Подтверждение сохранности функциональных свойств клеток. Чаще всего это оценка пролиферативной активности адгезированных на носителе клеток по уровню экспрессии гена *ki67* [16] или увеличению количества клеток, измеряемому в динамике по их суммарной метаболической активности [17] либо общему содержанию ДНК в ТИК с помощью реактивов PicoGreen [15, 16, 19, 20] или Hoechst [14, 23]. В случае использования МСК в качестве клеточного компонента ТИК считается необходимым подтвердить их мультипотентность: способность к направленной дифферен-

цировке *in vitro* в остеогенном, и/или хондрогенном, и/или адипогенном направлении [16–18].

3. Выявление изменений внутри клеток. В качестве параметра, отражающего состояние адгезированных на скаффолде клеток после процедуры размораживания, было предложено, например, оценивать строение их цитоскелета, в частности актиновых микрофиламентов. F-актин в значительной степени определяет форму клетки и ее передвижение по поверхности носителя и располагается преимущественно у внешней мембраны, поэтому в процессе криоконсервации подвергается воздействию внеклеточного льда и механической деформации подложки, что может приводить к его деполимеризации или локальной аккумуляции [17].

4. Выявление причин гибели клеток, например вследствие апоптоза либо нарушения целостности мембран [18], что определяет спектр образующихся постклеточных продуктов и индуцируемый ими иммунный ответ реципиента.

Изучение *in vitro* процессов, происходящих при замораживании/оттаивании ТИК, несомненно, поможет в поиске путей повышения эффективности криоконсервации конструкций, например за счет дополнительного покрытия скаффолдов факторами адгезии, подбора коктейля криопротекторов с наименьшими цитотоксическими свойствами, создания оптимального протокола охлаждения и т.д. Тем не менее следует помнить, что конечная цель исследований – получение биомедицинского продукта, который после размораживания (сразу или через определенное время) готов к трансплантации, обеспечивая при этом должный уровень безопасности и эффективности. Результаты трансплантации криоконсервированных ТИК лабораторным животным на данный момент в научной литературе нет. Будет ли отличаться функциональность свежеприготовленной и размороженной ТИК в месте имплантации (например, интенсивность миграции клеток в окружающие ткани, скорость резорбции матрикса и динамика его интеграции с собственными тканями реципиента, эффективность замещения поврежденных тканей, выраженность иммунного ответа и т.д.)? Именно эксперименты *in vivo* должны, по нашему мнению, ответить на этот вопрос и в итоге подтвердить эффективность технологии криоконсервации ТИК.

## Заключение

Разработка эффективной технологии криоконсервации тканеинженерных конструкций может стать важным этапом развития регенеративной медицины благодаря повышению доступности высокотехнологичных биомедицинских продуктов. За прошедшие почти два десятилетия исследований в этой области накоплен значительный эмпирический материал, однако данные о технологии в целом до сих пор остаются несистематизированными и противоречивыми. Сравнение работ разных научных групп, занимающихся криоконсервацией тканеинженерных конструкций, затруднено не

только вследствие отсутствия стандартизованных протоколов, но и из-за различных подходов к оценке конечного результата. В то же время по мере накопления экспериментальных данных произошел принципиальный переход в оценке эффективности криоконсервации от выполнения минимальных требований к сохранности тканеинженерных конструкций (ТИК после размораживания сохранила целостность, некоторая часть клеток жива и прикреплена к матриксу) к нацеленности на конечный результат (ТИК после размораживания сохранила свои функциональные свойства и готова к трансплантации). Множество используемых в настоящее время *in vitro* методов исследования позволяет искать новые пути повышения эффективности криоконсервации тканеинженерных конструкций, однако, по нашему мнению, следующим этапом на пути внедрения технологии в клиническую практику должны стать исследования на экспериментальных животных.

### Литература/References

- Rahmani Del Bakhshayesh A, Annabi N, Khalilov R, Akbarzadeh A, Samiei M, Alizadeh E et al. Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(4):691–705. DOI: 10.1080/21691401.2017.1349778.
- Fu L, Yang Z, Gao C, Li H, Yuan Z, Wang F et al. Advances and prospects in biomimetic multilayered scaffolds for articular cartilage regeneration. *Regen Biomater.* 2020;7(6):527–42. DOI: 10.1093/rb/rbaa042.
- Ansari M. Bone tissue regeneration: Biology, strategies and interface studies. *Prog Biomater.* 2019;8(4):223–37. DOI: 10.1007/s40204-019-00125-z.
- Gilbert-Honick J, Grayson W. Vascularized and innervated skeletal muscle tissue engineering. *Adv Healthc Mater.* 2020;9(1):e1900626. DOI: 10.1002/adhm.201900626.
- Zhang YS, Yue K, Aleman J, Moghaddam KM, Bakht SM, Yang J et al. 3D Bioprinting for tissue and organ fabrication. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(1):148–63. DOI: 10.1007/s10439-016-1612-8.
- Hoffman T, Khademhosseini A, Langer R. Chasing the paradigm: Clinical translation of 25 years of tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2019;25(9–10):679–87. DOI: 10.1089/ten.TEA.2019.0032.
- Geris L, Papantonou I. The third era of tissue engineering: Reversing the innovation drivers. *Tissue Eng Part A.* 2019;25(11–12):821–6. DOI: 10.1089/ten.TEA.2019.0064.
- Brockbank KGM. Tissue Engineering Constructs and Commercialization. In: *Madame Curie Bioscience Database.* Austin (TX): Landes Bioscience; 2000–2013. Bookshelf ID: NBK6008. Brockbank KGM. Tissue. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6008/>
- Wang S, Elliott GD. Preservation strategies that support the scale-up and automation of tissue biomanufacturing. *Curr Stem Cell Rep.* 2018;4:138–48. DOI: 10.1007/s40778-018-0126-8.
- Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.* 2017;6(1):12–8. DOI: 10.1016/j.imr.2016.12.001.
- Kofron MD, Opsitnick NC, Attawia MA, Laurencin CT. Cryopreservation of tissue engineered constructs for bone. *J Orthop Res.* 2003;21(6):1005–10. DOI: 10.1016/S0736-0266(03)00103-7.
- Petrenko YA, Petrenko AY, Martin I, Wendt D. Perfusion bioreactor-based cryopreservation of 3D human mesenchymal stromal cell tissue grafts. *Cryobiology.* 2017;76:150–3. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.001.
- Batnyam O, Suye S, Fujita S. Direct cryopreservation of adherent cells on an elastic nanofiber sheet featuring a low glass-transition temperature. *RSC Adv.* 2017;7:51264–71. DOI: 10.1039/C7RA10604A.
- Miyoshi H, Ehashi T, Ohshima N, Jagawa A. Cryopreservation of fibroblasts immobilized within a porous scaffold: Effects of pre-culture and collagen coating of scaffold on performance of three-dimensional cryopreservation. *Artif Organs.* 2010;34(7):609–14. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2009.00933.x.
- Farooque TM, Chen Z, Schwartz Z, Wick TM, Boyan BD, Brockbank KG. Protocol development for vitrification of tissue-engineered cartilage. *Bioprocessing.* 2009;8(4):29–36. DOI: 10.12665/j84.brockbank.
- Wu Y, Wen F, Gouk SS, Lee EH, Kuleshova L. Cryopreservation strategy for tissue engineering constructs consisting of human mesenchymal stem cells and hydrogel biomaterials. *Cryo Letters.* 2015;36(5):325–35. PMID: 26574680.
- Bissoyi A, Pramanik K, Panda NN, Sarangi SK. Cryopreservation of hMSCs seeded silk nanofibers based tissue engineered constructs. *Cryobiology.* 2014;68(3):332–42. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.04.008.
- Gurruchaga H, Saenz Del Burgo L, Garate A, Delgado D, Sanchez P, Orive G et al. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells in an allogeneic bioscaffold based on Platelet Rich Plasma and synovial fluid. *Sci Rep.* 2017;7(1):15733. DOI: 10.1038/s41598-017-16134-6.
- Costa PF, Dias AF, Reis RL, Gomes ME. Cryopreservation of cell/scaffold tissue-engineered constructs. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(11):852–8. DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0649.
- Wen F, Magalhães R, Gouk SS, Bhakta G, Lee KH, Huttmacher DW et al. Vitreous cryopreservation of nanofibrous tissue-engineered constructs generated using mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15(1):105–14. DOI: 10.1089/ten.tec.2008.0237.
- Liu BL, Mcgrath J, McCabe L, Baumann M. Cellular response of murine osteoblasts to cryopreservation: the influence of attachment to hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Afr J Biotechnol.* 2006;5(21):2014–9. DOI: 10.5897/AJB06.202.
- Urbani L, Camilli C, Phylactopoulos DE, Crowley C, Natarajan D, Scottoni F et al. Multi-stage bioengineering of a layered oesophagus with *in vitro* expanded muscle and epithelial adult progenitors. *Nat Commun.* 2018;9(1):4286. DOI: 10.1038/s41467-018-06385-w.
- Yin H, Cui L, Liu G, Cen L, Cao Y. Vitreous cryopreservation of tissue engineered bone composed of bone marrow mesenchymal stem cells and partially demineralized bone matrix. *Cryobiology.* 2009;59(2):180–7. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.06.011.
- Reichard A, Asosingh K. Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry. *Cytometry A.* 2019;95(2):219–26. DOI: 10.1002/cyto.a.23690.

25. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
26. *van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD.* Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015;8:47. DOI:10.1186/s13104-015-1000-8.
27. *Bonnier F, Keating ME, Wróbel TP, Majzner K, Baranska M, Garcia-Munoz A et al.* Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(1):124–31. DOI:10.1016/j.tiv.2014.09.014.
28. *Stepanenko AA, Dmitrenko VV.* Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015;574(2):193–203. DOI:10.1016/j.gene.2015.08.009.
29. *Solanas E, Sostres C, Serrablo A, García-Gil A, Aranguren F, Jimenez P et al.* Incubation with dimethyl sulfoxide prior to cryopreservation improves functionality of thawed human primary hepatocytes. *Biopreserv Biobank.* 2012;10(5):446–53. DOI:10.1089/bio.2012.0015.
30. *Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V, Rodrigues RM.* Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. *Methods Mol Biol.* 2017;1601:19–26. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9\_2.
31. *Orellana EA, Kasinski AL.* Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation. *Bio Protoc.* 2016;6(21):e1984. DOI: 10.21769/BioProtoc.1984.
32. *Zhang X, Yang L, Zhang C, Liu D, Meng S, Zhang W et al.* Effect of polymer permeability and solvent removal rate on in situ forming implants: Drug burst release and microstructure. *Pharmaceutics.* 2019;11(10):520. DOI:10.3390/pharmaceutics11100520.
33. *Pashley DH, Carvalho RM, Tay FR, Agee KA, Lee KW.* Solvation of dried dentin matrix by water and other polar solvents. *Am J Dent.* 2002;15(2):97–102. PMID: 12092999.

### Информация об авторах

Ирина Владимировна Арутюнян – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Татьяна Клеониковна Дубовая – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

### Author information

Irina V. Arutyunyan – Cand. Sci. (Biol), Senior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology.  
<https://orcid.org/0000-0002-4344-8943>

Tatiana K. Dubovaya – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-7936-180X>