

Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова
Научно-исследовательская лаборатория клеточного репрограммирования
Московская школа на Юго-Западе № 1543

**Оптимизация состава криопротекторной среды для заморозки
плюрипотентных стволовых клеток мыши и человека**

Работу выполнили:

А.А. Пашлова
М. А. Фёдоров

Научные руководитель:

Эрдэм Баирович Дашинимаев

Супервайзер:

Екатерина Дмитриевна Момотюк

Оглавление:

ВВЕДЕНИЕ	3
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	4
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	6
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	10
ВЫВОДЫ	19
БЛАГОДАРНОСТИ	19
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	20

Введение

Криоконсервация плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) является очень важной частью современной медицины, так как она обеспечивает долгосрочное хранение, стандартизацию и доступность клеток для фундаментальных и прикладных исследований, а также для регенеративной медицины и клеточной терапии. Несмотря на существующие протоколы криоконсервации, до сих пор остаётся проблема потери клеточного материала из-за механических повреждений, осмотического стресса, апоптоза и токсичности криопротекторов.

Наиболее часто используемые методы основаны на применении проникающих криопротекторов, таких как диметилсульфоксид (DMSO), в сочетании с медленным охлаждением или витрификацией. Однако эти подходы могут вызывать вышеперечисленные проблемы. Особенно чувствительными к таким повреждениям являются эмбриональные (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) человека и животных. Именно из-за этого коммерчески доступные криосреды не всегда могут обеспечить должную выживаемость — они просто не рассчитаны на конкретные клеточные линии.

Кроме того, состав большинства таких растворов является запатентованным или засекреченным, что ограничивает возможности адаптации протоколов к специфическим исследовательским или клиническим задачам. К тому же зачастую они являются достаточно дорогими, из-за чего становится выгоднее разрабатывать криосреду самостоятельно.

Таким образом, разработка и оптимизация новых криопротекторных составов, имеющих высокую эффективность для плюрипотентных стволовых клеток, представляет собой важную научно-практическую задачу. Оптимизация криосред поможет повысить эффективность криоконсервации, снизить затраты на культивирование и расширить возможности использования ПСК в клеточной терапии, трансплантации и биотехнологических производствах.

Целью нашей работы является подбор оптимального состава криопротекторных сред для заморозки плюрипотентных стволовых клеток человека и мыши.

Задачи:

1. Подготовка криопротекторных сред для заморозки ПСК и оценка выживаемости ПСК на этих криосредах после цикла заморозки-оттаивания.

2. Сравнение эффективности выживания ПСК на разработанной криосреде по сравнению с коммерчески доступными криопротекторными средами.

Обзор литературы

1. Основные принципы и проблемы криоконсервации клеток

Главная проблема при криоконсервации — повреждение клеток и тканей из-за образования льда и химических процессов. Поэтому основной задачей является минимизация этих повреждений.

Повреждения могут быть механическими и химическими. Первые происходят в результате образования внутриклеточного и внеклеточного льда (из-за которого впоследствии происходит дегидратация); неравномерного охлаждения или нагревания клетки (из-за чего происходит разрыв мембран) [12, 14].

Химические же повреждения наступают при медленном охлаждении, когда вода движется во внеклеточное пространство в соответствии с осмотическим градиентом, в результате клетка обезвоживается, внутри неё повышается концентрация солей, а при образовании льда у среды может возрастать концентрация солей и изменяться pH, в результате этого могут начинаться окислительные реакции [12, 14].

Чтобы это предотвратить, существуют криопротекторные среды. Они делятся на проникающие (DMSO, глицерин, этиленгликоль (EG), пропиленгликоль (PG)) и непроникающие (сахароза, трегалоза, полиэтиленгликоль (PEG), альбумин (BSA), поливинилпирролидон (PVP)). Первые являются малыми молекулами, проникающими внутрь клетки, они связываются с водой и снижают точку замерзания, предотвращая кристаллизацию, но также являются токсичными при высоких дозах. Вторые же являются крупными гидрофильными молекулами, они удерживают воду вне клетки, создавая внешний осмотический градиент [5].

2. Особенности криоконсервации ПСК

Разница между ЭСК и иПСК заключается в способе их получения. Первые получают из эмбрионов, созданных с помощью ЭКО, на стадии бластоцисты. Вторые получают путём перепрограммирования соматических клеток с помощью определённых факторов (в частности, Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc). При этом ЭСК более уязвимы при заморозке, так как имеют более тонкие мембраны и являются более чувствительными в связи с тем, что существуют в колониях и сообщаются друг с другом посредством e-кадгериновой

опосредованной адгезии. При нарушении этих контактов запускается каскад апоптоза, вызванный накоплением белка p53, который, в свою очередь, стимулирует ROCK (Rho-associated kinase). Она же усиливает механическое напряжение мембраны, разрушая клетку.

В свою очередь, и ПСК лучше адаптированы к одиночному росту, хотя также растут в колониях. К тому же среди них часто отбираются линии с наилучшей выживаемостью, что повышает устойчивость к заморозке [3, 8, 15]. Однако эта относительная устойчивость может реализовываться только при соблюдении оптимальных условий криоконсервации, одним из которых является правильный выбор клеточной плотности.

При криоконсервации клеток важно соблюдать достаточную плотность кл/мл, так как при слишком низкой плотности ПСК более подвержены осмотическому давлению и механическому стрессу. К тому же после разморозки им сложнее восстанавливать колонии. При высокой же плотности криопротекторы хуже проникают в клетки, а в плотных скоплениях повышается риск гипоксии и апоптоза.

Также в криоконсервации ПСК не менее важен сам способ заморозки. Существует медленное замораживание (понижение температуры на 1 °C/минуту при 10 % DMSO в криосреде), но при нём ПСК имеют высокий уровень апоптоза, поэтому к клеткам добавляют ROCK-ингибиторы (малые молекулы, блокирующие активность ROCK) [2]. Также применяется витрификация (мгновенное погружение в жидкий азот при высокой концентрации криопротекторных агентов (КПА)), но криосреды для этого метода могут иметь высокую токсичность для клеток [7, 11].

Таким образом, криоконсервация ПСК представляет собой сложный процесс, требующий тщательной оптимизации множества параметров, таких как клеточная плотность, способ заморозки и правильная криопротекторная среда.

3. Существующие криопротекторные среды для ПСК

DMSO является одним из самых распространённых криопротекторов. Он используется как при витрификации, так и при медленном замораживании, но проявляет цитотоксичность и может вызывать эпигенетические изменения, так как способен изменять экспрессию генов, а также вступать в реакцию с ROS (Reactive Oxygen Species), усиливая окислительные повреждения. Тем не менее при нужной концентрации (~5 %) он проявляет высокую эффективность и малую токсичность [6].

Существуют альтернативы DMSO для ПСК, такие как трегалоза (стабилизирует внутриклеточные структуры, но не может проникнуть внутрь

клетки самостоятельно), этиленгликоль и пропиленгликоль (менее токсичны, чем DMSO), глицерин (менее токсичен, чем DMSO, но медленно проникает в клетки, из-за чего слабо подходит для витрификации), BSA (стабилизирует клетки и их белковую структуру). Часто эти КПА используются вместе, так как их совместная эффективность повышается.

Также широко применяют сахарозу — она стабилизирует клеточные мембраны (связываясь с головками фосфолипидов), смягчает осмотический шок, а также уменьшает апоптоз. Помимо этого, для выживаемости как ЭСК, так и иПСК добавляют ROCK-ингибиторы (в частности, Y-27632); они блокируют путь ROCK, значительно улучшая выживаемость и прикрепление клеток [1, 6, 9, 16].

Все эти КПА при правильном использовании повышают эффективность криосред.

Одной из главных проблем коммерческих криосред является в основном скрытый состав и нераскрытые добавки (что может привести к нарушению плюрипотентности ПСК и эпигенетическим изменениям). Также проблемы могут вызывать высокая токсичность из-за DMSO и сыворотка, которая часто добавляется к 10 % DMSO и является опасной для ЭСК, низкая эффективность для некоторых линий ПСК (так как криосреды разрабатываются как универсальные, а разные линии ПСК имеют разную чувствительность) и высокая стоимость [13].

Появляются современные подходы к оптимизации криоконсервации ПСК. Например, концентрация DMSO снижается до 5 %, производятся DMSO-free (из-за токсичности DMSO) и бессывороточные (из-за инфекционного риска и иммуногенности сыворотки) среды. Всё чаще эти компоненты заменяются на сахара [4].

Для решения проблем криоконсервации продолжают разрабатывать новые, улучшенные соединения, которые устраняют проблемы токсичности, образования льда и апоптоза.

Материалы и методы

Клетки

Эксперименты проводили на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека (иПСК) и эмбриональных стволовых клетках мыши (mES). iPS-KYOU были получены в лаборатории Синъи Яманаки (Киотский

университет, Япония) путём ретровирусного перепрограммирования фибробластов кожи взрослых. Клеточная линия iPS-KYOU была приобретена у ATCC Cell Bank (Kyou-DXR0109B, ACS-1023™, ATCC®, США). mES-DGES1 были получены из бластоцист мышей линии 129S2/SvPascl. Клеточная линия mES-DGES1 была любезно предоставлена Алексеем Гавриловичем Мензоровым (ИЦИГ СО РАН, Россия).

Криосреды, используемые для заморозки клеток

Растворы, используемые для изготовления криосред:

- DMEM/F12 (1:1) без глутамина, «ПанЭко», Россия
- DMSO, «Bio Froxx», Германия
- EG, «Sigma-aldrich», США
- Раствор альбумина 7,5% в PBS, «ПанЭко», Россия
- HEPES buffer solution 1M, «Gibco», США
- Сахароза, «Sigma-aldrich», США

Состав криосред, используемых в 1 серии экспериментов:

- A:10% DMSO + 90% DMEM
- B:10% DMSO + 10%EG+ 80% DMEM
- C:10%DMSO + 10%EG + 0,2% BSA + 79,8% DMEM
- D:10% DMSO + 10%EG + 0,2 %BSA + 10mM HEPES + 78,8% DMEM

Состав криосред, используемых во 2 серии экспериментов:

- D2:10% DMSO + 10%EG + 2 %BSA + 10mM HEPES + 77% DMEM
- E:10% DMSO + 10%EG + 2 %BSA + 10mM HEPES + 17% сахарозы + 60% DMEM
- F:15% DMSO + 15%EG + 2 %BSA + 10mM HEPES + 17% сахарозы + 50%DMEM
- G:20% DMSO + 20%EG + 2 %BSA + 10mM HEPES + 17% сахарозы + 40% DMEM

В 3 серии экспериментов наиболее эффективные криосреды сравнивали с коммерческой криосредой КриоМед-М («ПанЭко», Россия).

Прежде чем использовать растворы соединений, их фильтровали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Заморозка клеток

Для дальнейшей заморозки клетки открепляли от культуральной посуды раствором аккутазы («HiMedia», Индия). Для промывки от аккутазы клетки разбавляли в растворе Дюльбекко («ПанЭко», Россия) в соотношении 1:1 и центрифугировали при 1,5 тыс. об/мин в течение 5 минут. Затем отбирали супернатант и разводили клеточный осадок в 1 мл криосреды.

В первой серии экспериментов замораживали по 3×10^5 клеток в одной ампуле, во второй и третьей — по $1,5 \times 10^6$ клеток в одной ампуле. Клетки помещали в криопробирки («Kirgen», США).

В первых двух сериях экспериментов для каждой криосреды использовали по одной ампуле. В третьей серии экспериментов для первоначального тестирования также проводили заморозку с одной ампулой на каждую среду, после чего, отобрав наиболее эффективные варианты, выполняли повторное замораживание с тремя ампулами на каждую криосреду.

Затем клетки замораживали при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов, после чего помещали в жидкий азот при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в сосуды Дьюара на 72 часа.

Культуральные среды

Мышиные ЭСК (мЭСК) культивируются при стандартных условиях: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , влажность 100%.

Среда для культивирования N2B27 + 2i + hLif.

Состав:

- ROCK ингибитор, «Sigma-Aldrich», США
- Нейробазальная среда, «ПанЭко», Россия
- ДМЕМ/F12 (1:1), «ПанЭко», Россия
- Пируват натрия, «Gibco», США
- Glutargo, «Corning», США
- Пенициллин-стептомицин (PenStrep), «Gibco», США
- β -Mercaptoethanol, «Sigma-Aldrich», США

- NEAA, «Servicebio», Китай
- N2 supplement, «ПанЭко», Россия
- B27 (NSC21) supplement, «Capricorn», Германия
- Аскорбиновая кислота, «Sigma-Aldrich», США
- CHIR99021, «Sigma-Aldrich», США
- PD0325901, «Sigma-Aldrich», США
- hLif, «Sci-store», Россия

iPS-KYOU культивируются при стандартных условиях: 37°C, 5% CO₂, влажность 100%.

Для культивирования iPS-KYOU используется коммерческая среда **mTeSR1**.

Состав:

- mTeSR1, «Stem Cell Technologies», Канада
- ROCK ингибитор, «Sigma-Aldrich», США
- mTeSR1 5x Supplement, «Stem Cell Technologies», Канада
- Пенициллин-стрептомицин (PenStrep), «Gibco», США

Разморозка и анализ выживаемости клеток

Для разморозки клеток использовали водяную баню при температуре 37 °C. Далее клетки разводили в ростовой среде и высаживали на 12-луночные планшеты («Costar», США), заранее покрытые Matrigel. На каждую ампулу приходилось по три лунки.

Спустя 24 часа после посадки клетки прикреплялись; их фиксировали формалином. Для лучшей визуализации клетки окрашивали 0,3 % раствором трипанового синего (Trypan Blue, «Sigma-Aldrich», США). Далее, клетки фотографировали, на каждую лунку делали по 5 фотографий. С помощью программы ImageJ (плагин Cell counter) считали количество выживших после разморозки клеток на каждой фотографии, затем находили среднее значение выживших клеток для площади фотографии. После этого рассчитывали среднее количество выживших клеток на всю площадь лунки.

Для сравнения эффективности различных криосред использовали графический анализ в программе GraphPad Prism.

Покрытие культурального пластика Matrigel: 2 % раствор Matrigel наливали в культуральную посуду, исходя из соотношения 1 мл на 10 см², инкубировали в течение 1 часа при +37 °C, после чего раствор сливали и промывали один раз свежей средой DMEM/F12. Использовали сразу после промывки.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью t-критерия Стьюдента, который применяется для оценки различий между двумя независимыми выборками. Для сравнения средних значений выборок использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Все статистические расчёты и построения графиков проводились с помощью программы GraphPad Prism.

Результаты и обсуждение

Сравнение выживаемости клеток на экспериментальных криосредах

В первой серии экспериментов были исследованы четыре варианта криопротекторных сред (А, В, С и D) указанных в методике (см. раздел «Криосреды, используемые для заморозки клеток»), различающиеся по составу и содержащие различные комбинации следующих компонентов: диметилсульфоксид (DMSO), среду DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), этиленгликоль (EG), бычий сывороточный альбумин (BSA) и HEPES-буфер. Каждый из этих компонентов играет ключевую роль в защите клеток от криоповреждений, что подтверждено литературными данными.

Для сравнительного анализа эффективности криосред мы оценивали жизнеспособность клеток после криоконсервации. Результаты для линии IPS-KYOU и mES-DGES1 представлены на рис. 1 и 2 соответственно. На графиках отражена зависимость выживаемости клеточных линий от состава криопротекторной среды.

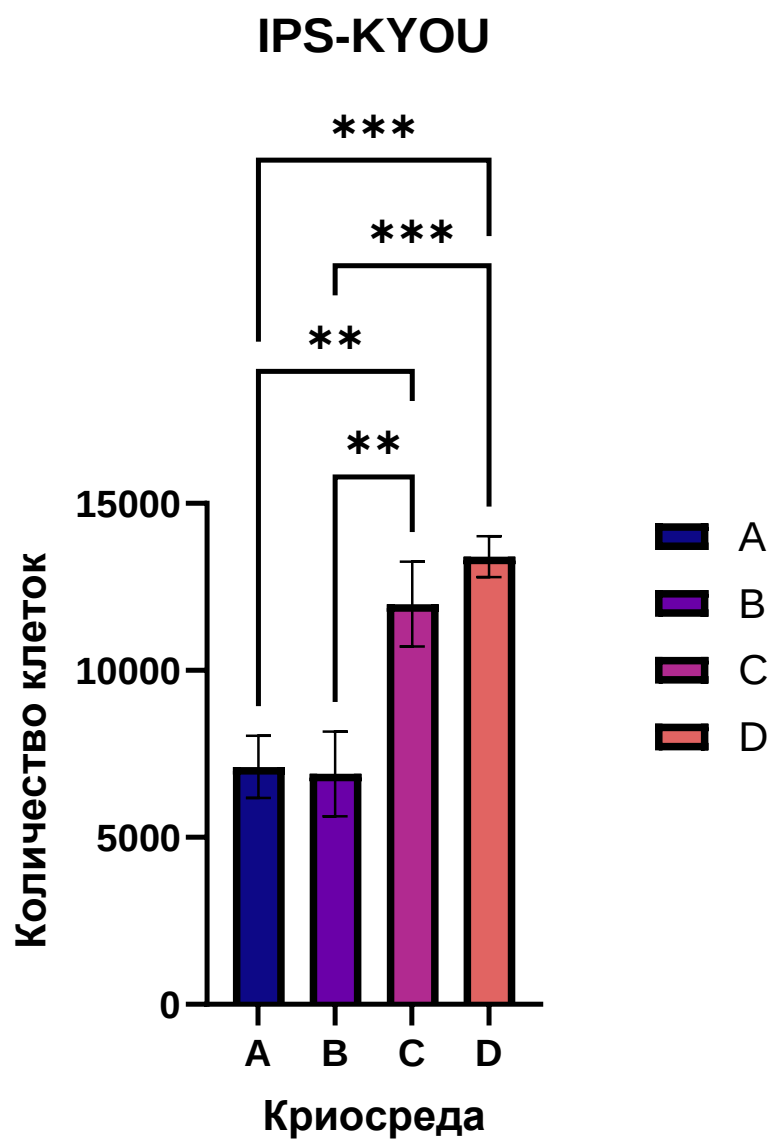


Рис. 1. Количество жизнеспособных клеток IPS-KYOU после размораживания в криосредах A, B, C и D

Примечание: ** - различия статистически значимы при $p < 0.01$ (t-критерий).

*** - различия статистически значимы при $p < 0.001$ (t-критерий).

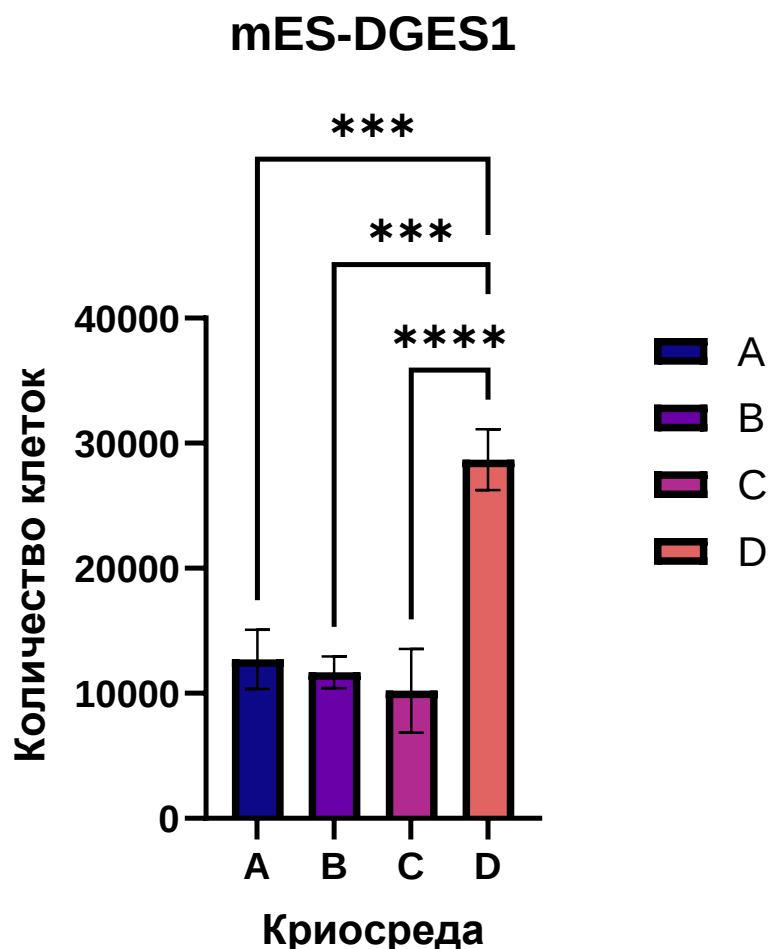


Рис. 2. Количество жизнеспособных клеток mES-DGES1 после размораживания в криосредах А, В, С и D

Примечание: ***- различия статистически значимы при $p < 0.001$ (t-критерий).

****- различия статистически значимы при $p < 0.0001$ (t-критерий).

Результаты первой серии экспериментов для линии клеток IPS-KYOU показали, что количество выживших клеток в криосреде С и D достоверно выше, по сравнению со средами А и В (рис. 1). Для линии клеток mES-DGES1 количество выживших клеток в криосреде D достоверно выше, по сравнению с криосредами А, В и С (рис. 2).

Несмотря на то, что количество выживших клеток линии IPS-KYOU в криосредах С и D не имеет статистически значимых различий ($p > 0.05$; рис. 1), в первой серии экспериментов криосреда D была взята за основу для дальнейших экспериментов, т.к. для клеток линии mES-DGES1 выживаемость клеток в среде D достоверно выше, по сравнению с криосредой С (рис. 2).

Для второй серии экспериментов среда D была модифицирована. По результатам первой серии экспериментов количество выживших клеток линий IPS-KYOU и mES-DGES1 в средах, содержащих BSA (среды C и D), достоверно выше, чем в средах, не содержащих BSA (среды A и B). Поэтому при модификации среды D увеличили концентрацию BSA в 10 раз. Данная концентрация BSA является оптимальной для ПСК, что подтверждается литературными данными [10]. Полученную криопротекторную среду назвали D2.

Во второй серии экспериментов были исследованы четыре новых варианта криопротекторных сред (D2, E, F и G), указанных в методике (см. раздел «Криосреды, используемые для заморозки клеток»), содержащие измененные концентрации компонентов, используемых в составе криосред A, B, C и D, а также сахарозу. Сахароза является непроникающим криопротектором и играет важную роль в защите клеток от криоповреждений, это подтверждено литературными данными. Поэтому было принято решение добавить сахарозу в состав криосред E, F и G.

Для сравнительного анализа эффективности криосред, мы также оценивали жизнеспособность клеток после криоконсервации. Результаты для линии IPS-KYOU и mES-DGES1 представлены на рис. 3 и 4 соответственно. На графиках отражена зависимость выживаемости клеточных линий от состава криопротекторной среды.

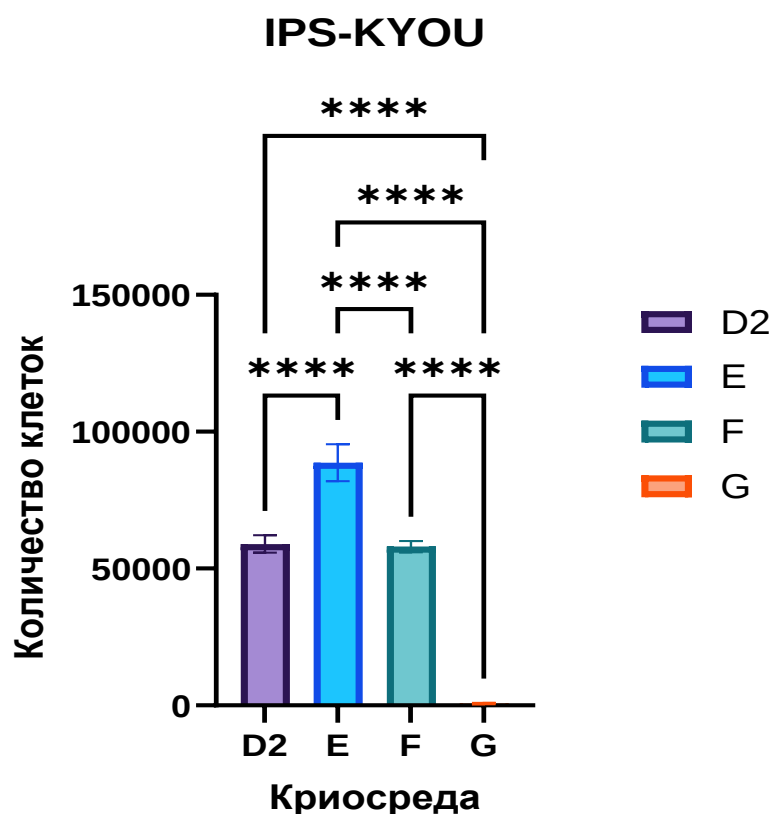


Рис. 3 Количество жизнеспособных клеток IPS-KYOU после размораживания в криосредах D2, E, F и G

Примечание: ****- различия статистически значимы при $p < 0.0001$ (t-критерий).

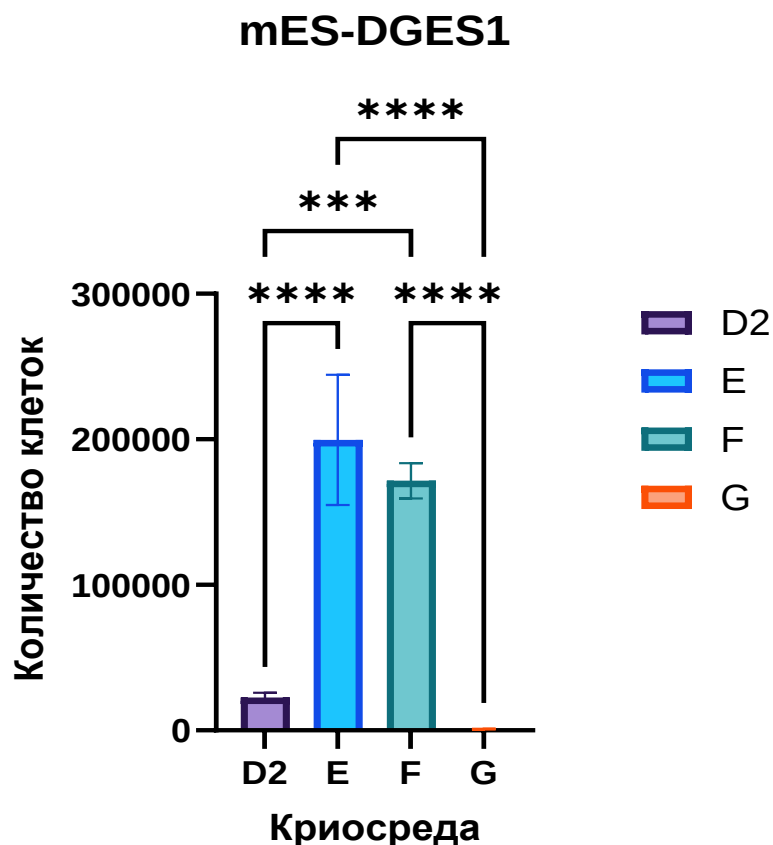


Рис. 4. Количество жизнеспособных клеток mES-DGES1 после размораживания в криосредах D2, E, F и G

Примечание: ***- различия статистически значимы при $p < 0.001$ (t-критерий).

****- различия статистически значимы при $p < 0.0001$ (t-критерий).

Результаты второй серии экспериментов для линии клеток IPS-KYOU показали, что количество выживших клеток в криосреде E достоверно выше, по сравнению со средами D2, F и G. Количество жизнеспособных клеток после разморозки в средах D2 и F достоверно не различается (рис. 3). Для линии клеток mES-DGES1 количество выживших клеток в криосреде E и F достоверно выше, по сравнению с криосредами D2 и G (рис. 4). Это может быть обусловлено появлением в криосредах E и F сахарозы.

В криосреде G количество жизнеспособных клеток для линий IPS-KYOU и mES-DGES1 после разморозки наименьшее, это может быть обусловлено высокими концентрациями DMSO и EG в составе среды, эти вещества являются проникающими криопротекторами и в выбранных концентрациях, вероятно, являются токсичными для клеток.

Так как среда E оказалась наиболее эффективной для обеих клеточных линий и количество жизнеспособных клеток в криосредах D2 и F (для клеточной линии IPS-KYOU) и криосреде F (для линии клеток mES-DGES1) значительно превышало количество жизнеспособных клеток в криосреде G, эти криосреды были выбраны для последующего сравнения с коммерческой криосредой КриоМед.

Сравнение с коммерческой криосредой

В третьей серии экспериментов эффективность изготовленных нами криосред D2, E и F сравнивали с эффективностью коммерческой криосреды КриоМед. КриоМед использовали в качестве контроля для сравнения с изготовленными нами криосредами. Для сравнительного анализа эффективности криосред мы также оценивали жизнеспособность клеток после криоконсервации. Результаты для линии IPS-KYOU и mES-DGES1 представлены на рис. 5 и 6 соответственно. На графиках отражена зависимость выживаемости клеточных линий от состава криопротекторной среды.

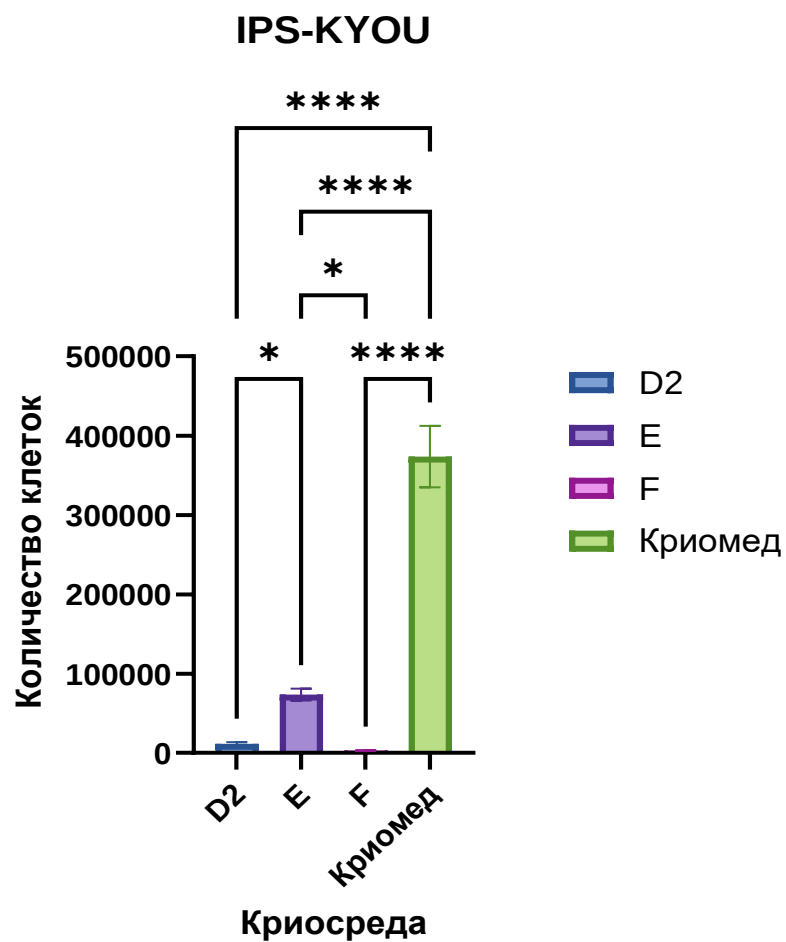


Рис. 5. Количество жизнеспособных клеток mES-DGES1 после размораживания в криосредах D2, E, F и КриоМед

Примечание: *- различия статистически значимы при $p < 0.05$ (t-критерий).

****- различия статистически значимы при $p < 0.0001$ (t-критерий).

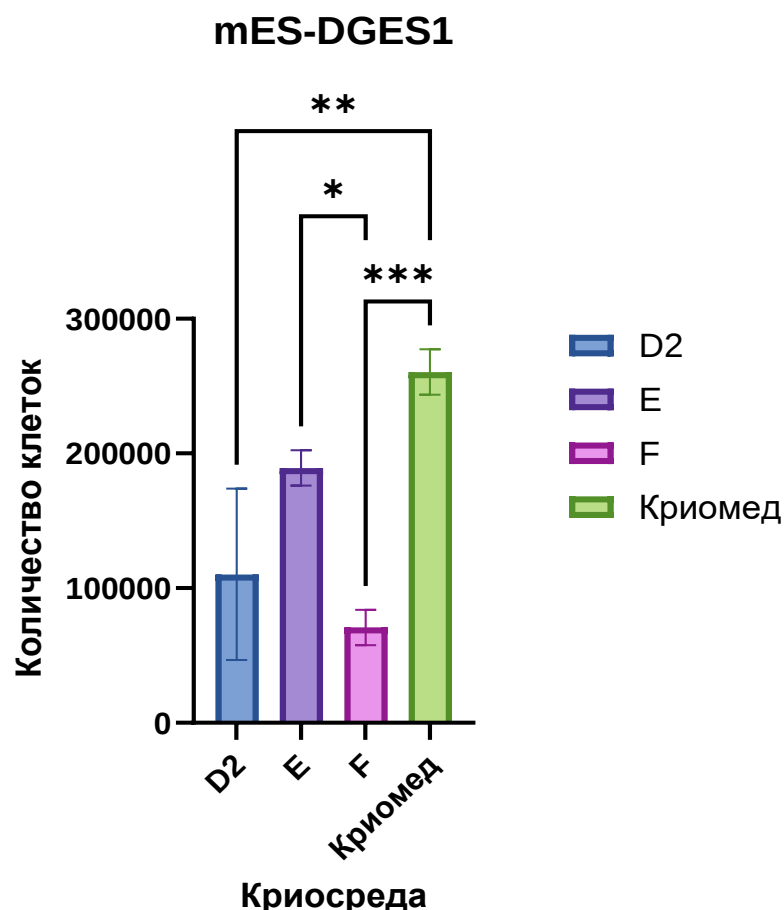


Рис. 6. Количество жизнеспособных клеток mES-DGES1 после размораживания в криосредах D2, E, F и КриоМед

Примечание: *- различия статистически значимы при $p < 0.05$ (t-критерий).

** - различия статистически значимы при $p < 0.01$ (t-критерий).

*** - различия статистически значимы при $p < 0.001$ (t-критерий).

Результаты третьей серии экспериментов для линии клеток IPS-KYOU показали, что количество выживших клеток в криосреде КриоМед достоверно выше по сравнению со средами D2, E и F (рис. 5). Количество жизнеспособных клеток после разморозки в криосреде E достоверно выше по сравнению со средами D2 и F. Для линии клеток mES-DGES1 количество выживших клеток в криосреде КриоМед достоверно выше по сравнению со средами D2 и F, но не имеет достоверных различий с криосредой E (рис. 6). Таким образом, среди изготовленных криосред криосреда E показала наибольшую эффективность для обеих клеточных линий и была выбрана для повторного сравнения с КриоМед.

Для более достоверного сравнения криосред E и КриоМед в четвертом эксперименте увеличили количество биологических повторов до 3.

Результаты для линии IPS-KYOU и mES-DGES1 представлены на рис. 7 и 8

соответственно. На графиках отражена зависимость выживаемости клеточных линий от состава криопротекторной среды.

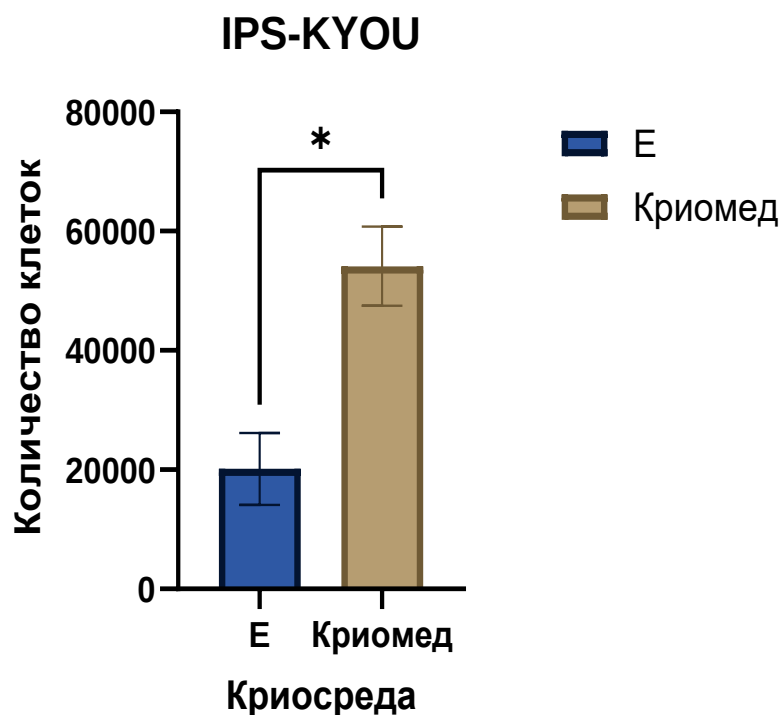


Рис.7. Сравнение количества выживших клеток IPS-KYOU в криосредах E и КриоМед

Примечание: *- различия статистически значимы при $p < 0.05$ (t-критерий).

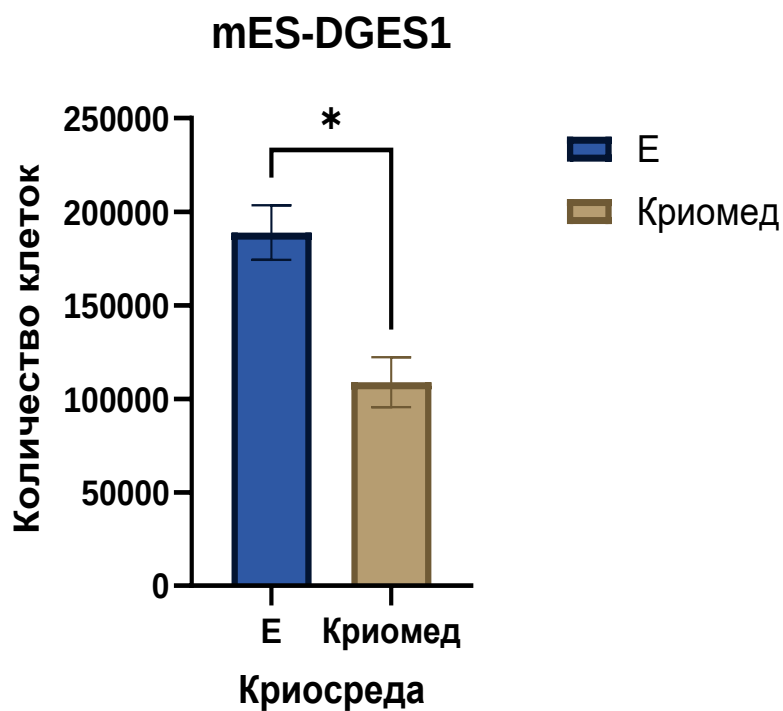


Рис. 8. Сравнение количества выживших клеток mES-DGES1 в криосредах E и КриоМед

Примечание: *- различия статистически значимы при $p < 0.05$ (t-критерий).

На рис. 7 и 8 мы наблюдаем различную эффективность криосреды Е в отношении исследуемых клеточных линий. Для линии клеток mES-DGES1 среда Е показала статистически значимо более высокую выживаемость по сравнению с коммерческой средой КримоМед ($p < 0.05$). Однако для IPS-KYOU наблюдалась обратная тенденция - их жизнеспособность после криоконсервации в среде Е была значительно ниже, чем в контрольной коммерческой среде.

Результаты нашего исследования демонстрируют, что BSA и сахароза являются важными компонентами и их появление в составе криосред повышает выживаемость клеток. Однако для линии IPS-KYOU эти компоненты не так повышают выживаемость, как коммерческая среда КримоМед. Такие результаты могут быть обусловлены различной чувствительностью к компонентам между этими линиями и состав криосреды для линии IPS-KYOU необходимо оптимизировать.

Выводы

- 1) В результате оценки выживаемости ПСК после цикла заморозки-оттаивания криосреда Е оказалась наиболее эффективной из 8 изготовленных нами криосред (А, В, С, D, D2, Е, F, G).
- 2) Сравнение наиболее эффективной криосреды Е с коммерческой средой КримоМед показало, что изготовленная нами криосреда Е является более эффективной, чем коммерческая среда для линии клеток mES-DGES1 и менее эффективной для линии клеток IPS-KYOU.

Благодарности

Мы благодарим Глаголева Сергея Менделевича и Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова за организацию лабораторной практики. Мы благодарны Дашинимаеву Эрдэму Баировичу за возможность работы в лаборатории и Момотюк Екатерине Дмитриевне за помощь в выполнении работы. А также благодарим Галиакберову Аделю Альбертовну за предоставление клеточных линий.

Список литературы

1. Arutyunyan, I. et al., 2021, Influence of sucrose on the efficiency of cryopreservation of human umbilical cord-derived multipotent stromal cells with the use of various penetrating cryoprotectants // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 171 (1). P. 150-155.
2. Chen, G. et al., 2011, Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture // Nature methods. 8 (5). P. 424-429.
3. Chin, M. H. et al., 2009, Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures // Cell stem cell. 5 (1). P. 111-123.
4. Dobruskin, M. et al., 2024, Optimizing cryopreservation strategies for scalable cell therapies: A comprehensive review with insights from iPSC-derived therapies // Biotechnology Progress. 40 (6). e3504.
5. Elliott, G. D. et al., 2017, Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures // Cryobiology. 76. P. 74-91.
6. Fahy, G. M. et al., 1990, Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms // Cryobiology. 27 (3). P. 247-268.
7. Hubel, A. 1997, Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. // Transfusion medicine reviews. 11 (3). P. 224-233.
8. Jacobson, E. et al., 2018, Who Will Win: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells for β Cell Replacement and Diabetes Disease Modeling? // Current Diabetes Reports. 18 (12). P. 133.
9. Kaushal, R. et al., 2022, Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation solutions for hematopoietic stem cell grafts // Cytotherapy. 24 (3). P. 272-281.
10. Liu, Y. et al., 2010, Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions // Biotechnology Progress. 26 (6). P. 1635-1643.
11. Loutradi, K. E. et al., 2008, Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: systematic review and meta-analysis. // Fertility and sterility. 90 (1). P. 186-193.
12. Mazur, P., 1984, Freezing of living cells: mechanisms and implications // American journal of physiology-cell physiology. 247 (3). C125-C142.
13. Parihar, A. et al., 2023, Cryopreservation: A Comprehensive Overview, Challenges, and Future Perspectives // Advanced Biology. 7 (6). 2200285.

14. Pegg, D.E., 2009, Preservation of human Oocytes // CRC press p.13
15. Qin, H. et al., 2007. Regulation of Apoptosis and Differentiation by p53 in hESC // Journal of Biological Chemistry. 282 (8). P. 5842-5852.
16. Watanabe, K. et al., 2007, A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells // Nature biotechnology. 25 (6). P. 681-686.