

УДК 57.086.83:577.112.386:577.164:615.014.41

DOI: 10.15587/2519-8025.2026.356113

ВПЛИВ ЖЕЛАТИНУ НА ВЛАСТИВОСТІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ТА ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ В СКЛАДІ АЛЬГІНАТНИХ КАПСУЛ ТИПУ «ЯДРО-ОБОЛОНКА»

О. С. Губеня, Sara Leal-Marin, Н. А. Труфанова, Є. Г. Іванов, Birgit Glasmacher, О. Ю. Петренко

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are widely used in regenerative medicine and cell engineering; however, conventional two-dimensional culture systems fail to reproduce the physiological microenvironment of cells and limit the preservation of their functional state.

Objective. *This study aimed to investigate the effect of gelatin concentration in the core of alginate core-shell capsules on the viability, metabolic activity and spatial organisation of human bone marrow-derived MSCs.*

Materials and Methods. *Alginate core-shell capsules were fabricated using coaxial electrospinning with an alginate shell and hydrogel core containing different gelatin concentrations (0, 2.5, 5 and 7.5% w/v). Rheological properties of the core and shell materials were analysed by rotational rheometry. Cell viability was assessed using Live/Dead fluorescence staining, metabolic activity by Alamar Blue assay, and spatial organisation by light and fluorescence microscopy. Capsules were cultured under physiological conditions for 17 days and subsequently transferred to ambient temperature storage.*

Results. *All capsule formulations supported high MSC viability during long-term culture. However, the functional state of the cells strongly depended on the core composition. Capsules containing 2.5% gelatin demonstrated the most pronounced increase in metabolic activity and the formation of interconnected, network-like cellular structures. Increasing gelatin concentration to 5–7.5% resulted in reduced metabolic activity and the formation of compact cell aggregates. Following storage at ambient temperature (22 °C), metabolic activity decreased in all groups, whereas cell viability remained stable.*

Conclusions. *Gelatin concentration within the capsule core is a key parameter regulating MSC functional behaviour in three-dimensional culture systems. Alginate core-shell capsules represent a promising platform for short-term storage and transportation of cells while maintaining their viability and structural organisation*

Keywords: *mesenchymal stromal cells; alginate capsules; core-shell systems; gelatin; 3D cell culture; metabolic activity; cell viability; cell encapsulation; ambient storage; tissue engineering*

© The Author(s) 2026

This is an open access article under the Creative Commons CC BY license

How to cite:

Hubenia, O., Leal-Marin, S., Trufanova, N., Ivanov, I., Glasmacher, B., Petrenko, O. (2026). Effect of gelatin on the properties of mesenchymal stromal cells during cultivation and hypothermic storage within core-shell alginate capsules. ScienceRise: Biological Science, 1 (45), 19-29. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2026.356113>

1. Вступ

Мезенхімальні стромальні клітини (МСК) привертають значну увагу в галузі регенеративної медицини та тканинної інженерії завдяки своїй паракринній активності, здатності стимулювати регенерацію тканин і ангиогенез, а також імуномодулювальним властивостям, опосередкованим секрецією біоактивних молекул, зокрема VEGF та TGF- β [1, 2]. МСК можуть бути ізолювані з різних тканинних джерел, зокрема кісткового мозку, жирової тканини, вартонового желе та пуповинної крові, і за відповідних умов здатні до диференціації в остеогенному, хондрогенному та адипогенному напрямках [3]. Сукупність цих властивостей робить МСК цінним інструментом для клітинних терапій і доклінічних дослідницьких моделей.

Однак традиційне культивування МСК зазвичай здійснюється у двовимірних (2D) моношарових культурах, які не відтворюють складне тривимірне (3D) мікрооточення, притаманне фізіологічним умовам *in vivo*. За тривалого пасажування в 2D-культурі клітини втрачають ознаки стовбуровості, демонструють змінену морфологію та знижену паракринну активність [4]. Це зумовило зростаючий інтерес до розробки сучасних 3D-систем культивування, здатних імітувати позаклітинний матрикс і забезпечувати більш фізіологічно релевантні умови для клітин [5].

Серед різних підходів до 3D-культивування, особливо перспективною, вважається інкапсуляція клітин у гідрогелеві матриці [6]. Гідрогелі формують високо гідратоване, біосумісне середовище, яке сприяє дифузії поживних речовин і кисню та водно-

час забезпечує механічний захист клітин [7, 8]. Альгінат - природний полісахарид, отриманий з бурих водоростей, – є одним із найпоширеніших біоматеріалів для клітинної інкапсуляції завдяки своїй біосумісності, м'якому гелеутворенню за участі двовалентних катіонів і можливості регулювання фізичних властивостей [9, 10]. Альгінатний гідрогель є неімуногенним та може зшиватись у вигляді волокон або капсул, що робить його придатним для широкого спектра біомедичних застосувань [11–14].

Водночас у випадку подовженого культивування та транспортування за АТ важливо забезпечити контроль масопереносу та стабільність гелю. Для стандартних альгінатних мікросфер існує залежність дифузійних і механічних характеристик від розміру АМС, умов гелеутворення та ступеня зшивання [15–17]. Тому було запропоновано керованіші архітектури, зокрема системи типу «ядро-оболонка» [18], важливим практичним аспектом котрих, є можливість короткострокового амбієнтного зберігання та транспортування інкапсульованих клітин. Для таких сценаріїв необхідно забезпечити стабільність геометрії капсул, збереження механічних властивостей за відсутності активного контролю середовища.

У таких системах внутрішнє ядро створює біосумісне середовище для клітин, забезпечуючи підтримку їх життєздатності та проліферації, тоді як зовнішня оболонка надає механічну стабільність і виконує функцію селективного бар'єра для імунних клітин та макромолекул. АК типу «ядро-оболонка» дозволяють покращити контроль дифузії, регулювати товщину, жорсткість і проникність оболонки відповідно до вимог конкретного застосування, що розширює можливості використання альгінату як матеріалу для іммобілізації клітин [19]. У контексті культивування МСК такий підхід є особливо доцільним, оскільки він може сприяти формуванню 3D-клітинних сфероїдів, посиленню міжклітинної взаємодії та відтворенню елементів природної тканинної організації [15, 16, 20].

Важливим аспектом функціонування інкапсуляційних систем є поведінка розчинів для інкапсуляції, яка безпосередньо впливає на технологічність процесу формування капсул. Реологічні дослідження альгінатних гелів надають ключову інформацію щодо в'язкості, тиксотропних властивостей і динаміки зшивання. Ці параметри визначають відтворюваність процесу капсулоутворення, а також якість мікрооточення інкапсульованих клітин. Забезпечення належної механічної стабільності за збереження біосумісності є критичною передумовою успішної інкапсуляції МСК [21–23].

Таким чином, інкапсуляція МСК в АК типу «ядро-оболонка» є перспективною стратегією подолання обмежень традиційних 2D-культур шляхом створення біоміметичного 3D-мікрооточення.

Мета дослідження. Метою даного дослідження було отримання альгінатних капсул типу «ядро-оболонка», а також оцінка життєздатності, метаболічної активності та просторової організації інкапсульованих МСК упродовж культивування та зберігання за АТ. Очікується, що отримані результати сприятимуть оптимізації 3D-систем культивування МСК та

розширенню їх застосування в регенеративній медицині й тканинній інженерії.

2. Матеріали та методи

2.1. Культивування мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку людини

Мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку людини (bmMSCs), характеризуються адгезією до пластику, фібробластоподібною морфологією та мультіпотентністю, зокрема здатністю до остеогенної, хондрогенної та адипогенної диференціації [24–26], надані д-р Івонною Роджер (Clinic for Orthopedy, Hannover Medical School), були використані в даному дослідженні. Дослідження проводили відповідно до чинного законодавства та інституційних етичних вимог.

МСК розморожували та культивували в культуральному середовищі (KC) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Bio&SELL GmbH, Нюрнберг, Німеччина), доповненому 10% (v/v) Німеччина, 1% (v/v) пеніцилін-стрептоміцину (Sigma-Aldrich, США; кінцеві концентрації: 100 ОД/мл пеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину та 0,25 мкг/мл амфотерицину В), 1% L-глутаміну (Carl Roth GmbH, Карлсруе, Німеччина), 25 мМ буфера HEPES (Bio&SELL GmbH, Нюрнберг, Німеччина) та 2 мкг/л рекомбінантного людського базального фактора росту фіброblastів (FGF, PeproTech, США).

Клітини культивували за температури 37°C у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ в адгезивних культуральних флаконах (TPP, Швейцарія). KC змінювали кожні 2-3 дні. За досягнення приблизно 80% конfluenceнтності, клітини пересівали, зазвичай через 7 діб культивування.

Для пасажування, клітини промивали 10 мл фосфатно-сольового буфера (PBS, Medicago), після чого трипсинізували 2 мл 0,05% розчину трипсину/EDTA (Biochrom AG) протягом 5 хвилин за 37°C, 5% CO₂. Реакцію трипсинізації зупиняли додаванням 8 мл культурального середовища. Клітинну суспензію переносили в центрифужні пробірки (Sarstedt, Німеччина) та центрифугували при 1000 об/хв протягом 5 хвилин. Осад клітин ресуспендували в культуральному середовищі та підраховували.

Підрахунок клітин здійснювали за допомогою автоматичного лічильника Vi-Cell XR (Beckman Coulter, Німеччина) із використанням стандартних налаштувань для типу клітин bmMSCs: діапазон діаметра клітин 10-50 мкм, яскравість 90% і різкість 120. Зазначені параметри застосовувалися у всіх експериментах.

2.2. Підготовка альгінатних і желатинових розчинів для інкапсуляції клітин

Розчин натрій-альгінату (Sigma-Aldrich, США, A2158-250G) концентрацією 2,5% (w/v) готували в стерильному буфері HEPES (154 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7,4) з перемішуванням при 350 об/хв протягом щонайменше 14 годин.

Желатинові розчини з концентрацією 2,5–12,5% (w/v) готували шляхом розчинення желатину в буфері HEPES при температурі 37°C, після чого розчини фільтрували через серію фільтрів із різним роз-

міром пор: 0,65; 0,45 та 0,22 мкм. Усі розчини, що застосовувалися в процесі електророзпилення, зберігали при 4°C у захищених від світла умовах та попередньо нагрівали до 37°C безпосередньо перед використанням.

2. 3. Реологічні дослідження матеріалів ядра та оболонки

Реологічні властивості альгінатних розчинів досліджували за допомогою ротаційного реометра (NETZSCH, Німеччина), оснащеного конусно-пластинчастою геометрією. Реєстрацію кривих течії проводили в діапазоні швидкостей зсуву 0,1-1000 с⁻¹ за АТ. Визначали в'язкість і зсувно-розріджувальну поведінку (shear-thinning), а отримані дані обробляли з використанням програмного забезпечення виробника.

2. 4. Інкапсуляція bmMSCs в альгінатні капсули типу «ядро-оболонка» та оптимізація параметрів процесу

АК типу «ядро-оболонка» виготовляли методом коаксіального електророзпилення з використанням модифікованих описаних раніше методик [19]. Установа складалася з двоканального шприцевого насоса, з'єданого з коаксіальною тупокінцевою голкою з нержавіючої сталі (1,55 мм; 21G), високовольтного генератора (10 кВ, 0,014 мА) та заземленої ванни для гелеутворення, що містила 100 мМ розчин CaCl₂.

Швидкість подачі розчину оболонки (альгінат) варіювали в межах 20–40 мл/год, тоді як швидкість подачі розчину ядра (желатин або культуральне середовище) – у межах 2,5–10 мл/год. Після формування АК витримували у ванні з CaCl₂ протягом 30 хвилин для завершення процесу зшивання, після чого промивали та зберігали в буфері HEPES або культуральному середовищі при 24 °C або 37 °C залежно від умов експерименту.

Для інкапсуляції у АК структури «ядро-оболонка», МСК ресуспендували в желатиновому розчині або культуральному середовищі з концентрацією $0,5 \times 10^6$ клітин/мл, які використовували як розчин ядра. Усі процедури інкапсуляції проводили в асептичних умовах.

Отримані АК переносили в культуральні чашки діаметром 150 мм (TPP, Швейцарія) та інкубували за стандартних умов. Живильне середовище змінювали кожні 2–3 дні. Інкапсульовані клітини аналізували протягом 17 діб продовженого культивування, а також, додатково, протягом 7 діб зберігання за АТ (дні 0, 3, 5 і 7).

2. 5. Оцінка життєздатності клітин

Життєздатність клітин визначали за допомогою флуориметричного тесту Live/Dead, який ґрунтується на використанні флуоресцентних барвників для розрізнення життєздатних та некротичних клітин [27]. Найчастіше застосовуються комбінації барвників флуоресцеїндіацетат (FDA) з пропідій йодидом (PI) [27] або кальцеїн-АМ з етідіум-гомодимером-1 (EthD) [19].

У даному дослідженні для оцінки життєздатності використовували комбінацію барвників FDA та

EthD. Для кожного зразка щонайменше три капсули обережно вилучали з культуральної чашки за допомогою стерильної ложечки та переносили в окремі лунки 96-лункової планшетки. АК двічі промивали фосфатно-сольовим буфером (ПБС) протягом 2 хвилин, після чого інкубували з розчином флуоресцентних барвників упродовж 20 хвилин при кімнатній температурі. Після інкубації барвниковий розчин видаляли, а капсули знову двічі промивали ПБС по 2 хвилини.

Усі маніпуляції проводили в умовах захисту від світла. Після фарбування АК переносили за допомогою пінцета в тримачі зразків і негайно аналізували за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

2. 6. Оцінка метаболічної активності клітин

Метаболічну активність інкапсульованих МСК оцінювали з використанням тесту Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific, США). АК переносили в 24-лункові планшетки, що містили культуральне середовище з додаванням 10% (v/v) реагенту Alamar Blue, та інкубували протягом 4 годин при 37 °C.

Після інкубації надосадову рідину відбирали, а абсорбцію вимірювали при довжинах хвиль 570 та 600 нм за допомогою спектрофотометра (BioTek Synergy HTX, Німеччина). Відсоток відновлення реагенту Alamar Blue розраховували відповідно до інструкцій виробника.

2. 7. Мікроскопія та аналіз просторової організації клітин

АК досліджували за допомогою інвертованого фазово-контрастного мікроскопа (Axio Vert, Zeiss, Німеччина). Моніторинг просторової організації клітин проводили за допомогою аналізу серії зображень з використанням програмного забезпечення ImageJ (Fiji) для оцінки розподілу клітин, формування клітинних агрегатів і кластерів усередині капсул.

2. 8. Статистичний аналіз

Усі експерименти виконували щонайменше в трьох повторностях, якщо не зазначено інше. Результати подано у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення (SD). Статистичну значущість визначали з використанням *t*-критерію Стьюдента або однофакторного чи двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з пост-хок тестом Tukey's, залежно від типу даних. Значення $p < 0,05$ вважали статистично значущим.

3. Результати дослідження

3. 1. Реологічні властивості матеріалів ядра та оболонки

Реологічні дослідження показали, що всі досліджувані рідини ядра демонстрували зсувно-розріджувальну (shear-thinning) поведінку, що проявлялося зменшенням в'язкості зі зростанням швидкості зсуву. Зі збільшенням концентрації желатину спостерігалось зростання динамічної в'язкості: зокрема, для 12,5% (w/v) желатину вона становила $6,7 \pm \pm 2,4$ мПа·с, тоді як для 2,5% (w/v) – $3,5 \pm 0,6$ мПа·с при швидкості зсуву 0,3 с⁻¹.

Альгінатні розчини, що використовувалися для формування оболонки, характеризувалися сутте-

во вищою в'язкістю (113–135 мПа·с) порівняно з рідинами ядра. Така різниця забезпечувала механічну стабільність оболонки під час електророзпилення та підтверджує визначальну роль альгінатної фази у формуванні й стабілізації структури капсул типу «ядро-оболонка» та дозволяє формування капсул з желатиновим ядром до 12,5% (w/v) включно.

3. 2. Формування капсул і морфологічні характеристики

Для оптимізації отримання капсул типу «ядро-оболонка» було проведено двоетапне параметричне дослідження (рис. 1). Для капсул із КС у ядрі (0% желатину), стабільне формування досягалося за співвідношення швидкостей потоків розчинів (ШП) ядра та оболонки 10:40 мл/год, відстані від сопла до ванни гелеутворення 5 см і напрузі 10 кВ, що забезпечувало утворення сферичної альгінатної оболонки з чітко сформованим центральним ядром і мінімальною кількістю дефектів.

Виходячи зі стандартного співвідношення ШП ядра до оболонки 1:4, подальші параметри підбирали з урахуванням в'язкості рідини ядра. Для альгінатних капсул із включенням желатину в ядро стабільне формування спостерігалось за концентрацій желатину в діапазоні 2,5–7,5% (w/v), тоді як вищі концентрації ($\geq 10\%$ w/v) призводили до частого руйнування капсул і втрати структури «ядро-оболонка».

Система оцінювання якості капсул показала, що процеси з використанням 2,5–7,5% (w/v) желати-

ну забезпечували високу якість капсул (7-8 балів з 10) та понад 80% інтактних структур, особливо за співвідношення витрат 1:4–1:8. Натомість за концентрацій желатину 10–12,5% (w/v) понад 50% капсул руйнувалися незалежно від обраних параметрів процесу.

Попередні дослідження демонстрували можливість застосування вищих концентрацій желатину для формування капсул типу «ядро-оболонка» з іншими типами клітин, зокрема клітинами MG-63 [28, 29]. Однак такі системи реалізовувалися за відмінних температурних режимів і з урахуванням специфіки конкретних клітинних ліній. Відомо, що зі збільшенням концентрації полімеру прискорюється формування гелевої структури під час охолодження та суттєво зростає в'язкість розчину [30], що негативно впливає на стабільність потоку при електророзпиленні.

Оскільки суспензії життєздатних МСК можуть оброблятися виключно при фізіологічній температурі 37°C, концентрації желатину понад 7,5% (w/v) виявилися непридатними для капсул із клітинним навантаженням через погіршення стабільності процесу та зростання частоти руйнування капсул. Таким чином, концентрації желатину 2,5–7,5% (w/v) забезпечують оптимальний баланс між стабільністю процесу, відтворенням та якістю капсул.

Для подальших експериментів з інкапсуляцією клітин було обрано концентрації желатину 0%, 2,5%, 5% та 7,5% (w/v), які позначено на рисунку 1 синіми рамками.

Концентрація желатину (%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5
ШП ядро:оболонка (мл/год : мл/год)						
2,5:20		5	6	7	6	3
4:20	7	6	3	4		
5:20	3	3	3	7	6	4
5:40		5	4	8	5	0
5,5:40		7	4	6		
6,5:40		6	4	6		
8:40	6	7	3	4		
10:30		3	3	6	4	4
10:40	9	3	5	5	7	0
100% інтактних капсул		Менше 80% інтактних капсул	Менше 50% інтактних капсул			

Рис. 1. Двофакторне оцінювання параметрів процесу інкапсуляції для оцінки якості капсул. Найбільш придатні комбінації параметрів обведено синім кольором

Просторова організація інкапсульованих клітин. Аналіз просторової організації МСК у складі капсул проводили на 14-ту добу культивування. Мікроскопічний аналіз виявив чітку залежність просторової організації МСК від концентрації желатину в ядрі капсул. У капсулах з КС (0% желатину) на 14-у добу культивування клітини були нерівномірно розподілені по об'єму ядра; деякі клітини адгезували і розпластувались на поверхні альгінатної оболонки, а деякі скупчувались на дні ядра АК та формували взаємопов'язані, тканиноподібні структури (рис. 2, а).

Для капсул із 2,5% (w/v) желатину були характерні дві морфологічні форми організації МСК: витягнуті клітини, що формували міжклітинні контакти та мережоподібні структури вздовж внутрішньої поверхні оболонки, а також невеликі мультиклітинні агрегати, розташовані в об'ємі ядра (рис. 2, б).

Така просторова організація свідчить про активну міжклітинну взаємодію та часткове ремоделювання гідрогелевого мікрооточення за наявності обмеженої кількості адгезивних сигналів.

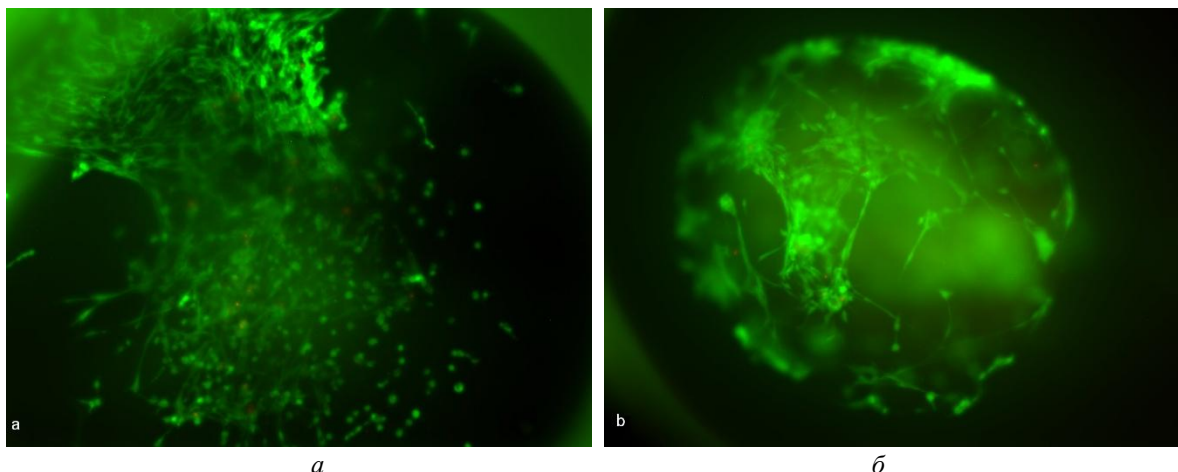


Рис. 2. Просторовий розподіл і життєздатність мезенхімальних стромальних клітин у капсулах типу «ядро-оболонка» на 14-ту добу культивування: *a* – альгінатні капсули з культуральним середовищем у ядрі (0% w/v); *б* – АК з включенням 2,5% (w/v) желатину в ядро. АК пофарбовано барвниками FDA/EthD та візуалізовано за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Життєздатні клітини позначено зеленим кольором (FDA), нежиттєздатні – червоним (EthD). У капсулах із культуральним середовищем у ядрі (0%) клітини були нерівномірно розподілені вздовж внутрішньої поверхні ядра, з переважним накопиченням у нижній частині капсули, та формували взаємопов'язані, тканиноподібні структури. У капсулах із 2,5% (w/v) желатину клітини рівномірніше розподілялися по міжфазовій поверхні оболонки та утворювали мережеподібні структури з міжклітинними контактами, а також невеликі мультиклітинні агрегати в об'ємі ядра

Натомість у капсулах із підвищеним вмістом желатину (5–7,5% w/v, рис.3.) клітини переважно формували компактні агрегати, локалізовані поблизу межі «оболонка-ядро», тоді як центральна частина ядра залишалася майже вільною від клітин. Такий розподіл може свідчити про витіснення клітин із то-

вщі ядра за рахунок підвищеної щільності матриксу та обмеженої рухливості клітин.

У найбільших агрегатах виявлялися поодинокі некротичні клітини, що вказує на локальні дифузійні обмеження в умовах підвищеної щільності желатину.

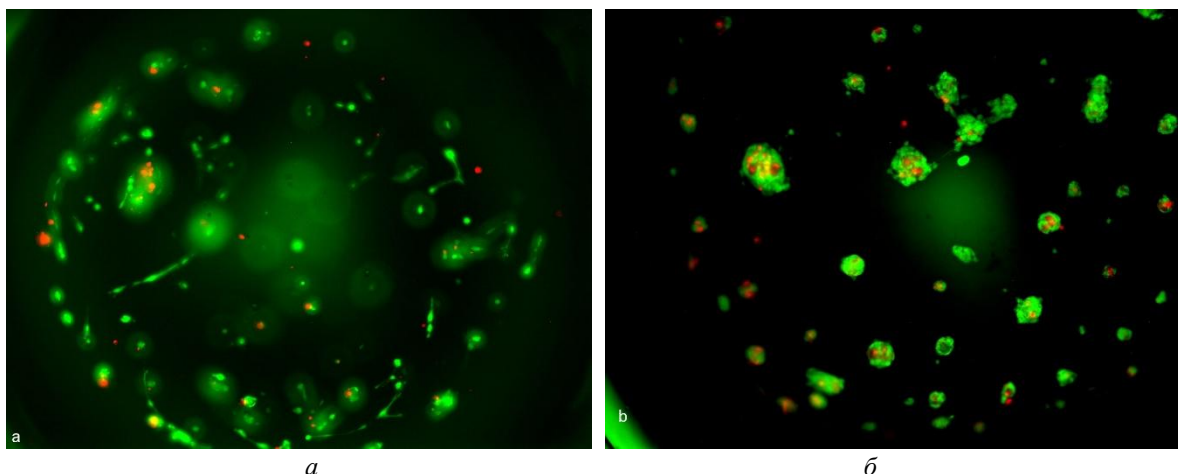


Рис. 3. Просторовий розподіл і життєздатність мезенхімальних стромальних клітин у альгінатних капсулах типу «ядро-оболонка» з включенням желатину в ядро на 14-ту добу культивування: *a* – АК з 5% (w/v) желатину; *б* – АК з 7,5% (w/v) желатину. АК пофарбовано барвниками FDA (зеленим позначено життєздатні клітини) та EthD (червоним - нежиттєздатні клітини) та візуалізовано за допомогою флуоресцентної мікроскопії. У капсулах із 5% желатину клітини формували мультиклітинні агрегати, розташовані як у межах ядра, так і поблизу міжфазової поверхні «оболонка-ядро». Натомість у капсулах із 7,5% желатину клітини переважно утворювали компактні агрегати, локалізовані біля межі «оболонка-ядро», тоді як центральна частина ядра залишалася майже вільною від клітин

3. 3. Життєздатність інкапсульованих МСК

Інкапсульовані МСК в АК типу «ядро-оболонка», культивували за стандартних фізіологічних умов (37°C, 5% CO₂, зволожена атмосфера) до 17-ї доби включно. Упродовж цього періоду життєздатність клітин демонструвала чітку залежність від кон-

центрації желатину та часу культивування в ядрі капсул та тривалості культивування (рис. 4, ліва панель).

У капсулах з КС (0% желатину) життєздатність МСК залишалася високою та відносно стабільною протягом усього періоду культивування до 17-ї доби, з середніми значеннями переважно понад

90%. Подібна тенденція спостерігалася і в капсулах із 2,5% (w/v) желатину.

У капсулах із 5% (w/v) желатину фіксувалося поступове зниження життєздатності, яке починалося з 7-ї доби культивування та посилювалося на 10-14-ту добу. Для капсул із 7,5% (w/v) желатину характерною була нелінійна динаміка життєздатності, що включала зниження показників на середніх часових точках із подальшим частковим підвищенням на пізніших етапах культивування.

Двохфакторний дисперсійний аналіз (two-way ANOVA) виявив статистично значущий вплив часу культивування на життєздатність МСК ($p < 0,0001$), а також значущий вплив концентрації желатину в ядрі капсул ($p < 0,0001$). Крім того, було зафіксовано значущу взаємодію між факторами «час» і «концентрація желатину» ($p < 0,0001$), що свідчить про різну динаміку змін життєздатності клітин залежно від складу ядра капсул. Post hoc аналіз за Тьюкі показав ста-

тистично значущі відмінності між окремими групами концентрацій желатину на визначених часових точках. Зокрема, на 10-ту добу культивування життєздатність клітин у капсулах із 0% желатину була достовірно вищою порівняно з капсулами із 5% желатину ($p = 0,0366$).

На 14-ту добу культивування виявлено статистично значуще зниження життєздатності клітин у капсулах із 5% желатину порівняно з 2,5% желатину ($p < 0,0001$). У межах групи 5% желатину життєздатність клітин достовірно знижувалася між 10-ю та 14-ю добами культивування ($p = 0,0380$), з подальшим частковим підвищенням до 17-ї доби ($p = 0,0017$).

Для капсул із 7,5% желатину також фіксувалися статистично значущі відмінності порівняно з групами 0% та 2,5% желатину на середніх і пізніх часових точках культивування ($p < 0,05$), що узгоджується з вираженою нелінійною динамікою життєздатності в цій групі.

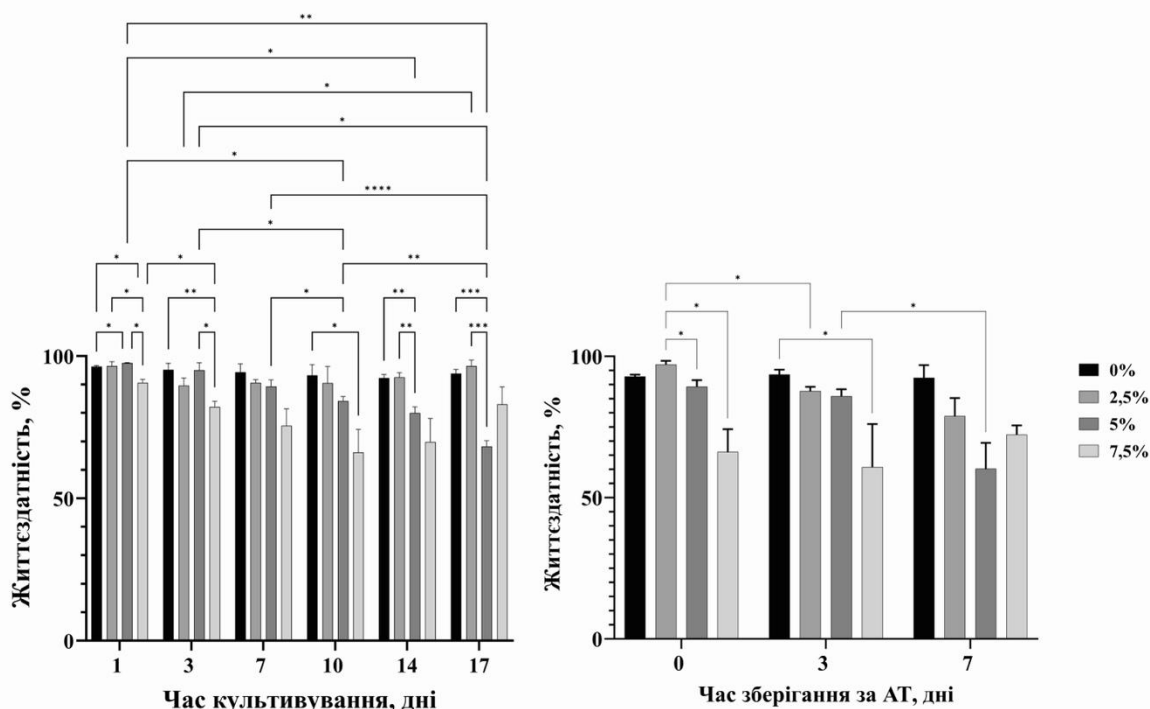


Рис. 4. Життєздатність мезенхімальних стромальних клітин у альгінатних капсулах типу «ядро-оболонка» під час культивування та АТ. Ліва панель – життєздатність клітин (%) упродовж культивування за фізіологічних умов (37°C, 5% CO₂) до 17-ї доби включно.

Права панель – життєздатність клітин (%) під час зберігання капсул за амбієнтної температури (22°C) в закритих контейнерах протягом 0-7 діб після 17-ї доби культивування.

Показано середні значення ± стандартне відхилення ($n = 6$, $N = 2$) для капсул із різною концентрацією желатину в ядрі: 0%, 2,5%, 5% та 7,5% (w/v). Статистичний аналіз виконано за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) з post hoc тестом Тьюкі. Статистично значущі відмінності позначено: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Після 17-ї доби культивування за фізіологічних умов АК з інкапсульованими МСК було переведено на зберігання за амбієнтної температури в закритих контейнерах, після чого життєздатність клітин оцінювали через 0, 3 та 7 діб (рис. 4, права панель).

На початку амбієнтного зберігання (0 доба) життєздатність клітин у капсулах з КС (0%) та з 2,5% (w/v) желатину становила в середньому 93-98%, тоді як у капсулах із 5% і 7,5% (w/v) желатину відповідні значення були нижчими та склали близько 85-90% і 65-70% відповідно. Через 3 доби зберігання життєздатність клітин у капсулах 0% і 2,5% желатину зни-

жувалася до приблизно 90–92% та 85–88% відповідно. Натомість у капсулах із 5% і 7,5% (w/v) желатину показники життєздатності зменшувалися більш суттєво та становили близько 75–80% і 55–65%.

На 7-му добу амбієнтного зберігання життєздатність клітин у капсулах без желатину (0%) залишалася на рівні близько 90%, у капсулах із 2,5% (w/v) желатину – 80–85%, тоді як у капсулах із 5% і 7,5% (w/v) желатину вона знижувалася до приблизно 60–65% і 70–75% відповідно. Виявлені відмінності між групами з низь-

ким (0–2,5%) та високим (5–7,5%) вмістом желатину були статистично значущими ($p < 0,05$).

3. 4. Метаболічна активність інкапсульованих МСК

Метаболічну активність інкапсульованих мезенхімальних стромальних клітин оцінювали за допомогою тесту Alamar Blue; усі значення було нормалізовано до 1-ї доби культивування (День 1 = 100%) (рис. 5).

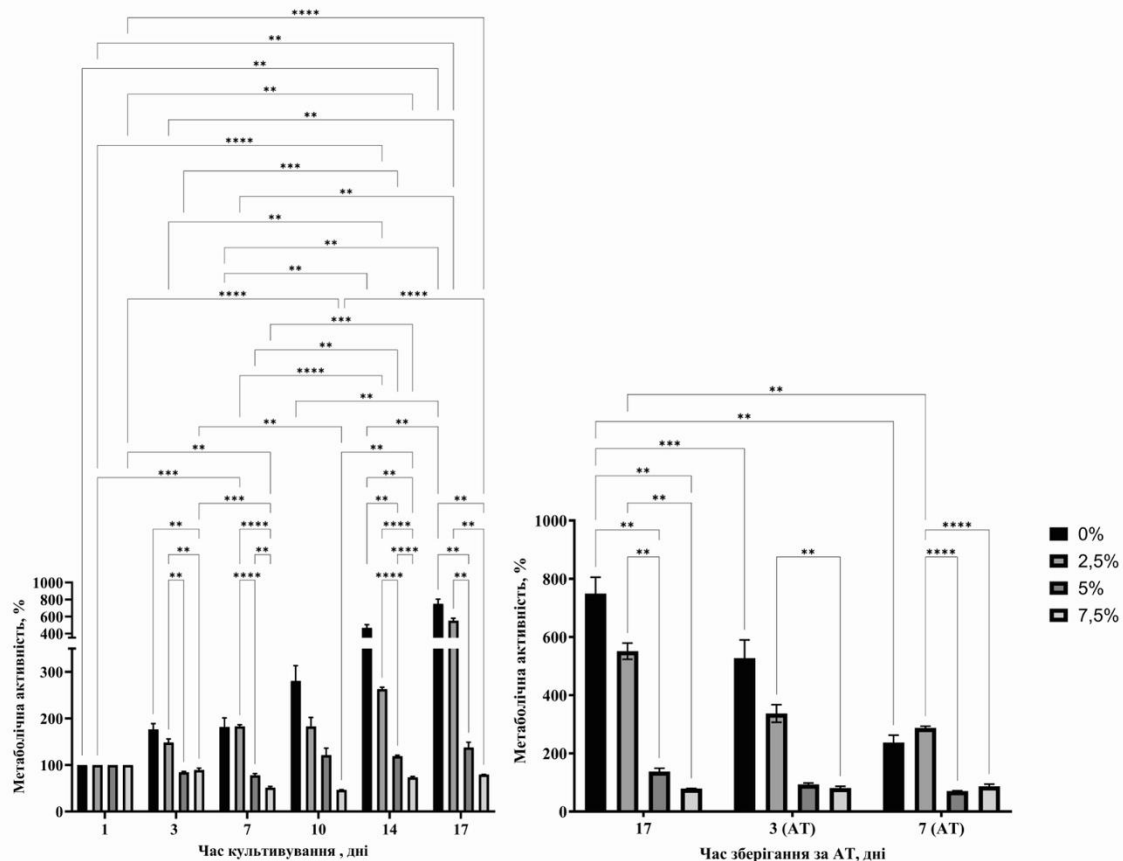


Рис. 5. Метаболічна активність мезенхімальних стромальних клітин, інкапсульованих в альгінатні капсули типу «ядро-оболонка», під час культивування та зберігання за АТ. Метаболічну активність оцінювали за допомогою тесту Alamar Blue. Усі значення нормалізовано до 1-ї доби культивування (День 1 = 100%). До 17-ї доби включно АК культивували за фізіологічних умов; після цього зразки переводили на зберігання за амбієнтної температури. Дані наведено як середнє значення \pm стандартне відхилення ($n = 3$). Статистичний аналіз виконано за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) з post hoc тестом Тьюкі; на графіку позначено лише відмінності з рівнем значущості $**p \leq 0,01$, $***p < 0,01$, $****p < 0,0001$

У капсулах з КС (0% желатину) спостерігалось виражене, часозалежне зростання метаболічної активності, яка підвищувалася з $176,5 \pm 12,2\%$ на 3-ю добу та $181,6 \pm 19,7\%$ на 7-му добу до $280,5 \pm 32,7\%$ на 10-ту добу і $466,5 \pm 36,7\%$ на 14-ту добу, досягаючи максимуму $749,3 \pm 55,8\%$ на 17-ту добу культивування. У капсулах із 2,5% желатину також відмічали зростання метаболічної активності, однак менш виражене порівняно з 0%: $148,2 \pm 7,7\%$ (3-тя доба), $183,0 \pm 3,6\%$ (7-ма доба), $182,8 \pm 19,2\%$ (10-та доба), $263,0 \pm 4,0\%$ (14-та доба) та $551,1 \pm 27,9\%$ на 17-ту добу культивування.

На відміну від цього, у капсулах із 5% желатину метаболічна активність на ранніх часових точках

була нижчою за базовий рівень і становила $84,3 \pm 1,8\%$ на 3-тю добу та $77,7 \pm 3,9\%$ на 7-му добу, з подальшим підвищенням до $121,3 \pm 15,0\%$ (10-та доба), $118,8 \pm 2,1\%$ (14-та доба) і $137,6 \pm 11,2\%$ на 17-ту добу. У капсулах із 7,5% желатину спостерігалось найбільш виражене зниження метаболічної активності відносно початкового рівня: $89,3 \pm 4,0\%$ (3-тя доба), $51,5 \pm 2,3\%$ (7-ма доба) та $46,6 \pm 0,6\%$ (10-та доба), з частковим відновленням до $73,4 \pm 2,1\%$ на 14-ту добу та $79,5 \pm 0,2\%$ на 17-ту добу культивування.

Після 17-ї доби культивування АК з інкапсульованими МСК переводили на зберігання за амбієнтної температури; метаболічну активність оцінювали на 0, 3 та 7-му добу зберігання, зберігаючи нормалі-

зацію до 1-ї доби культивування (День 1 = 100%) (рис. 5). У капсулах з КС (0%) метаболічна активність під час амбієнтного зберігання знижувалася з $749,3 \pm 55,8\%$ (0-та доба АТ) до $527,1 \pm 62,8\%$ на 3-тю добу та $237,3 \pm 25,1\%$ на 7-му добу. У капсулах із 2,5% желатину відповідні значення становили $551,1 \pm 27,9\%$, $496,3 \pm 32,6\%$ та $373,9 \pm 4,0\%$ на 0, 3 та 7-му добу амбієнтного зберігання відповідно. У капсулах із 5% желатину метаболічна активність зменшувалася з $137,6 \pm 11,2\%$ на початку амбієнтного зберігання до $93,5 \pm 4,8\%$ на 3-тю добу та $70,5 \pm \pm 0,8\%$ на 7-му добу. Для капсул із 7,5% желатину метаболічна активність залишалася відносно стабільною протягом усього періоду амбієнтного зберігання і становила $79,5 \pm 0,2\%$, $81,1 \pm 5,9\%$ та $86,8 \pm 6,4\%$ на 0,3 та 7-му добу відповідно.

4. Обговорення результатів дослідження

У роботі було досліджено вплив концентрації желатину в ядрі альгінатних капсул типу «ядро-оболонка» на життєздатність, метаболічну активність та просторову організацію МСК під час тривалого культивування та подальшого зберігання за амбієнтної температури. Отримані результати демонструють, що склад гідрогелевого ядра є ключовим чинником, який визначає як функціональний стан клітин, так і їх морфологічну організацію в 3D-мікрооточенні.

Динаміка життєздатності інкапсульованих МСК істотно залежала від концентрації желатину в ядрі. У капсулах без додавання желатину (0%) та з низькою його концентрацією (2,5% w/v) мезенхімальні стромальні клітини демонстрували стабільно високу життєздатність протягом усього періоду культивування. В обох варіантах відсоток життєздатних клітин залишався на рівні понад 80–90% без різко виражених спадів, що свідчить про сприятливі умови для виживання МСК у таких системах. Водночас в капсулах із 5% желатину спостерігалася поступове зниження життєздатності, тоді як для 7,5% характерною була нелінійна динаміка з тимчасовим спадом і подальшою стабілізацією життєздатності. Більше того, цей ефект не супроводжувався зростанням метаболічної активності, яка залишалася низькою для даної групи. Така невідповідність між показниками життєздатності та функціональної активності свідчить про те, що підвищення частки життєздатних клітин не відображає покращення їх функціонального стану та, ймовірно, зумовлене лізисом [31, 32] менш стійких клітин на ранніх етапах культивування з подальшим збереженням обмеженої субпопуляції клітин із зниженою метаболічною активністю [28]. У капсулах без желатину та з 2,5% желатину метаболічна активність МСК зростала з часом, що вказує на активну адаптацію клітин до 3D-середовища та формування метаболічно активних клітинних структур. Натомість у капсулах із 5% желатину метаболічна активність на ранніх термінах культивування була нижчою за базовий рівень, а подальше зростання залишалося обмеженим.

Поєднання даних щодо життєздатності та метаболічної активності вказує на те, що високі концентрації желатину створюють мікрооточення, яке підтримує виживання лише обмеженої субпо-

пуляції клітин із низькою метаболічною активністю. Ймовірно, це пов'язано з підвищеною щільністю гідрогелю, що обмежує дифузію кисню та поживних речовин, а також знижує клітинну міграцію та ремоделювання матриксу. Подібні ефекти описані й іншими авторами для щільних гідрогелевих систем, де зростання механічної жорсткості супроводжується зменшенням метаболічної активності та проліферації МСК, навіть за збереження високої життєздатності [33]. Під час зберігання за амбієнтної температури в усіх групах спостерігалася зниження метаболічної активності, що є очікуваним з огляду на відсутність контрольованих умов температури та газообміну. Важливо, що навіть за таких умов АК з низьким або помірним вмістом желатину зберігали метаболічну активність на рівні, вищому або порівнянному з базовим, що підкреслює потенціал альгінатних капсул як системи для короткочасного нефризингового зберігання клітинних конструкцій.

Аналіз просторової організації клітин додатково підтверджує роль мікрооточення як регулятора клітинної поведінки. У капсулах без желатину та з 2,5% (w/v) желатину мезенхімальні стромальні клітини формували розгалужені, мережеподібні структури та численні міжклітинні контакти вздовж внутрішньої поверхні оболонки, що свідчить про активну клітинно-клітинну взаємодію та самоорганізацію в 3D-середовищі. Натомість у капсулах із підвищеним вмістом желатину клітини переважно утворювали компактні агрегати поблизу меж «ядро-оболонка», а в найбільш щільних системах спостерігалися ознаки локальних дифузійних обмежень.

Слід зазначити, що альгінат є біологічно інертним полімером і не містить специфічних адгезивних мотивів для інтегративної взаємодії клітин з матриксом [34]. Відповідно, спостережувана витягнута морфологія клітин і формування мережеподібних структур у капсулах з 0% і 2,5% желатину не можуть бути пояснені прямою клітинно-матричною адгезією. Ймовірно, така організація клітин зумовлена комбінованою дією розчинних факторів середовища та клітинно-клітинних контактів.

Слід зазначити, що в роботі як стандартний компонент середовища для культивування МСК кісткового мозку використовувався базальний фактор росту фібробластів (FGF-basic), відомий своєю здатністю стимулювати проліферацію, клітинну міграцію та формування міжклітинних взаємодій [25]. У відсутності адгезивних сигналів з боку матриксу FGF-basic міг виступати ключовим регулятором клітинної активності [35], сприяючи формуванню витягнутої морфології та мережеподібних структур за рахунок посилення клітинно-клітинної комунікації та колективної міграції клітин [24].

Таким чином, просторову організацію МСК у капсулах з низьким або відсутнім вмістом желатину слід розглядати як результат взаємодії між фізичними властивостями інертного альгінатного матриксу та дією ростових факторів середовища, а не як наслідок прямої клітинно-матричної адгезії.

Загалом отримані результати демонструють, що фізико-хімічні властивості гідрогелевого ядра є

визначальними для функціонального стану та просторової організації мезенхімальних стромальних клітин у капсулах типу «ядро-оболонка» [36]. Отримані дані добре узгоджуються з літературними відомостями, які вказують, що жорсткість і склад гідрогелевого матриксу істотно впливають на морфологію, агрегатну поведінку та метаболічний стан МСК у тривимірних системах культивування [37]. Водночас слід зазначити, що більшість попередніх досліджень із використанням желатину виконувалися на інших типах клітин, зокрема остеобластоподібних лініях, для яких колаген або желатин є природним компонентом позаклітинного матриксу [38]. У цьому контексті результати, отримані в даній роботі, розширюють уявлення про роль желатину саме в системах тривимірного культивування МСК кісткового мозку.

Обмеження дослідження. Слід зазначити, що дослідження має певні обмеження. Робота виконана в умовах *in vitro*, а оцінка функціонального стану МСК обмежувалася показниками життєздатності та метаболічної активності без аналізу диференціаційного потенціалу чи секреторного профілю. Крім того, не проводилося пряме визначення дифузійних характеристик капсул, що може впливати на інтерпретацію отриманих результатів.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження доцільно спрямувати на розширену характеристику функціонального стану МСК, зокрема аналіз їх секреторної активності та диференціаційного потенціалу, а також на вивчення масопереносу в капсулах і його ролі у формуванні клітинної поведінки. Перспективним є також дослідження впливу контрольованих умов зберігання та перевірка ефективності системи в *in vivo* моделях.

5. Висновки

Показано, що альгінатні капсули типу «ядро-оболонка» забезпечують біосумісне тривимірне мікрооточення для мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку та дозволяють підтримувати їх високу життєздатність під час тривалого культивування.

Реологічні властивості матеріалів ядра й оболонки суттєво впливають на процес формування капсул: зсувно-розріджувальна поведінка альгінату забезпечує стабільність оболонки, тоді як підвищення в'язкості ядра обмежує відтворюваність структури капсул.

Встановлено, що концентрація желатину в ядрі капсул визначає функціональний стан інкапсульованих МСК, зокрема рівень їх метаболічної активності та характер адаптації до тривимірного середовища.

Найбільш сприятливі умови для збереження життєздатності, високої метаболічної активності та фізіологічної просторової організації МСК забезпечує використання 2,5% (w/v) желатину в ядрі капсул.

Підвищені концентрації желатину (5–7,5% w/v) супроводжуються зниженням метаболічної ак-

тивності клітин, незважаючи на відносно стабільні показники життєздатності, що свідчить про формування менш сприятливого клітинного мікрооточення.

Інкапсуляція МСК в альгінатні капсули типу «ядро-оболонка» з низкою концентрацією желатину або в його відсутності у ядрі підтримує життєздатність клітин при зберіганні за амб'єнтних температур.

Отримані результати доповнюють наявні дані щодо ролі желатину в тривимірних системах культивування та можуть бути використані для оптимізації 3D-культури МСК у дослідженнях кріобіології та клітинної інженерії.

Конфлікт інтересів

Автори декларують, що не мають конфлікту інтересів стосовно даного дослідження, в тому числі фінансового, особистісного характеру, авторства чи іншого характеру, що міг би вплинути на дослідження та його результати, представлені в даній статті.

Фінансування

Дослідження були фінансовані Національною Академією Наук України.

Доступність даних

Дані будуть надані за обґрунтованим запитом.

Використання засобів штучного інтелекту

Автори підтверджують, що не використовували технології штучного інтелекту при створенні представленої роботи.

Подяки

Автори щиро дякують Збройним Силам України за захист української державності та незалежності, а також партнерам, які стоять поруч з Україною. Автори також висловлюють свою вдячність студентам, які допомагали у зборі первинних даних та зробили свій внесок у деякі частини цього дослідження.

Внесок авторів

Губеня Олександра Сергіївна: Концептуалізація, Методологія, Дослідження, Аналіз даних, Формальний аналіз, Візуалізація, Написання – підготовка чернетки, Написання – рецензування та редагування; **Sara Leal Marin:** Дослідження, Аналіз даних, Візуалізація, Написання – рецензування та редагування; **Труфанова Наталя Анатоліївна:** Дослідження, Ресурси, Курування даних; **Іванов Євген Геннадійович:** Методологія, Формальний аналіз, Написання – рецензування та редагування; **Birgit Glasmacher:** Нагляд, Методологія, Написання – рецензування та редагування, Адміністрування проєкту; **Петренко Олександр Юрійович:** Концептуалізація, Нагляд, Написання – рецензування та редагування, Адміністрування проєкту.

Jireparypa

1. Merimi, M., El-Majzoub, R., Lagneaux, L., Moussa Agha, D., Bouhtit, F., Meuleman, N. et al. (2021). The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661532>
2. Song, N., Scholtemeijer, M., Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41 (9), 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>
3. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9 (1). <https://doi.org/10.1186/1478-811x-9-12>
4. Rybkowska, P., Radoszkiewicz, K., Kawalec, M., Dymkowska, D., Zabłocka, B., Zabłocki, K., Sarnowska, A. (2023). The Metabolic Changes between Monolayer (2D) and Three-Dimensional (3D) Culture Conditions in Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Adipose Tissue. *Cells*, 12 (1), 178. <https://doi.org/10.3390/cells12010178>
5. Kusuma, G. D., Li, A., Zhu, D., McDonald, H., Inocencio, I. M., Chambers, D. C. et al. (2022). Effect of 2D and 3D Culture Microenvironments on Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Potencies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.819726>
6. Pan, Y., Han, L., Yang, Y., Wu, X., Wang, A., Xie, L. et al. (2025). Alternating 2D and 3D culture reduces cell size and extends the lifespan of placenta-derived mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1632810>
7. Pangjantuk, A., Kaokaen, P., Kunhorm, P., Chaicharoenaudomrung, N., Noisa, P. (2024). 3D culture of alginate-hyaluronic acid hydrogel supports the stemness of human mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 14 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54912-1>
8. Yin, S., Wu, H., Huang, Y., Lu, C., Cui, J., Li, Y. et al. (2024). Structurally and mechanically tuned macroporous hydrogels for scalable mesenchymal stem cell–extracellular matrix spheroid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121 (28). <https://doi.org/10.1073/pnas.2404210121>
9. Ashimova, A., Yegorov, S., Negmetzhanov, B., Hortelano, G. (2019). Cell Encapsulation Within Alginate Microcapsules: Immunological Challenges and Outlook. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00380>
10. Eleftheriadou, D., Evans, R. E., Atkinson, E., Abdalla, A., Gavins, F. K. H., Boyd, A. S. et al. (2022). An alginate-based encapsulation system for delivery of therapeutic cells to the CNS. *RSC Advances*, 12 (7), 4005–4015. <https://doi.org/10.1039/d1ra08563h>
11. Lee, K. Y., Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37 (1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
12. Qian, W., Bai, H., Yan, Y., Bi, Q. (2024). Regulation of physicochemical properties of alginate-based hydrogels and preliminary applications in wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 283, 137617. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137617>
13. Sarker, B., Rompf, J., Silva, R., Lang, N., Detsch, R., Kaschta, J. et al. (2015). Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.061>
14. Caliarì, S. R., Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*, 13 (5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
15. Bennacef, C., Desobry, S., Probst, L., Desobry-Banon, S. (2023). Alginate Based Core–Shell Capsules Production through Coextrusion Methods: Recent Applications. *Foods*, 12 (9), 1788. <https://doi.org/10.3390/foods12091788>
16. Liang, X., Xie, L., Zhang, Q., Wang, G., Zhang, S., Jiang, M. et al. (2022). Gelatin methacryloyl–alginate core-shell microcapsules as efficient delivery platforms for prevascularized microtissues in endodontic regeneration. *Acta Biomaterialia*, 144, 242–257. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.03.045>
17. Wang, N., Adams, G., Buttery, L., Falcone, F. H., Stolnik, S. (2009). Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. *Journal of Biotechnology*, 144 (4), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.08.008>
18. Gryshkov, O., Pogozhykh, D., Hofmann, N., Pogozhykh, O., Mueller, T., Glasmacher, B. (2014). Encapsulating Non-Human Primate Multipotent Stromal Cells in Alginate via High Voltage for Cell-Based Therapies and Cryopreservation. *PLoS ONE*, 9 (9), e107911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107911>
19. Gryshkov, O., Mutsenko, V., Tarusin, D., Khayyat, D., Naujok, O., Riabchenko, E. et al. (2021). Coaxial Alginate Hydrogels: From Self-Assembled 3D Cellular Constructs to Long-Term Storage. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (6), 3096. <https://doi.org/10.3390/ijms22063096>
20. Rauch, J., Francis, E., Viljoen, H. (2024). Optimizing alginate tubes for cell culture. *Biomedical Engineering Advances*, 7, 100113. <https://doi.org/10.1016/j.bea.2024.100113>
21. Gladukh, I., Podorozhna, M. (2021). Study of structural and mechanical properties of sodium alginate gels. *EUREKA: Health Sciences*, 2, 82–89. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2021.001732>
22. Hilbig, J., Hartlieb, K., Gibis, M., Herrmann, K., Weiss, J. (2020). Rheological and mechanical properties of alginate gels and films containing different chelators. *Food Hydrocolloids*, 101, 105487. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105487>
23. Ouwerx, C., Velings, N., Mestdagh, M. M., Axelos, M. A. V. (1998). Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks*, 6 (5), 393–408. [https://doi.org/10.1016/s0966-7822\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/s0966-7822(98)00035-5)
24. Rebelatto, C. K., Aguiar, A. M., Moretão, M. P., Senegaglia, A. C., Hansen, P., Barchiki, F. et al. (2008). Dissimilar Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Adipose Tissue. *Experimental Biology and Medicine*, 233 (7), 901–913. <https://doi.org/10.3181/0712-rm-356>
25. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S. et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
26. Eyckmans, J., Lin, G. L., Chen, C. S. (2012). Adhesive and mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation in human bone marrow and periosteum-derived progenitor cells. *Biology Open*, 1 (11), 1058–1068. <https://doi.org/10.1242/bio.20122162>

27. Brun-Graepi, A. K. A. S., Richard, C., Bessodes, M., Scherman, D., Merten, O.-W. (2011). Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *Journal of Controlled Release*, 149 (3), 209–224. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.09.023>
28. Ke, C.-J., Chiu, K.-H., Chen, C.-Y., Huang, C.-H., Yao, C.-H. (2021). Alginate-gelatin based core-shell capsule enhances the osteogenic potential of human osteoblast-like MG-63 cells. *Materials & Design*, 210, 110109. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110109>
29. Khanmohammadi, M., Zolfaghazadeh, V., Bagher, Z., Soltani, H., Ai, J. (2020). Cell encapsulation in core-shell microcapsules through coaxial electrospinning system and horseradish peroxidase-catalyzed crosslinking. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 6 (1), 015022. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/ab6035>
30. Depta, P. N., Gurikov, P., Schroeter, B., Forgács, A., Kalmár, J., Paul, G. et al. (2021). DEM-Based Approach for the Modeling of Gelation and Its Application to Alginate. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62 (1), 49–70. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01076>
31. Braissant, O., Astasov-Frauenhoffer, M., Waltimo, T., Bonkat, G. (2020). A Review of Methods to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.547458>
32. Kroll, P., Eilers, K., Fricke, J., & Herwig, C. (2016). Impact of cell lysis on the description of cell growth and death in cell culture. *Engineering in Life Sciences*, 17 (4), 440–447. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600088>
33. Garcia-Aponte, O. F., Kahlenberg, S., Kouroupis, D., Egger, D., Kasper, C. (2025). Effects of Hydrogels on Mesenchymal Stem/Stromal Cells Paracrine Activity and Extracellular Vesicles Production. *Journal of Extracellular Vesicles*, 14 (3). <https://doi.org/10.1002/jev2.70057>
34. Neves, M. I., Moroni, L., Barrias, C. C. (2020). Modulating Alginate Hydrogels for Improved Biological Performance as Cellular 3D Microenvironments. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00665>
35. Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., Pan, H., Koike, C., Yoshida, E. et al. (2001). Retention of Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Cells during Proliferation in Response to FGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288 (2), 413–419. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5777>
36. Discher, D. E., Janmey, P., Wang, Y. (2005). Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science*, 310 (5751), 1139–1143. <https://doi.org/10.1126/science.1116995>
37. Nichol, J. W., Koshy, S. T., Bae, H., Hwang, C. M., Yamanlar, S., Khademhosseini, A. (2010). Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 31 (21), 5536–5544. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.064>
38. Bupphathong, S., Quiroz, C., Huang, W., Chung, P.-F., Tao, H.-Y., Lin, C.-H. (2022). Gelatin Methacrylate Hydrogel for Tissue Engineering Applications – A Review on Material Modifications. *Pharmaceuticals*, 15 (2), 171. <https://doi.org/10.3390/ph15020171>

Received 11.02.2026

Received in revised form 16.03.2026

Accepted 23.03.2026

Published 31.03.2026

Олександра Сергіївна Губеня*, молодший науковий співробітник, відділ кріобіохімії, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна, 61016, Researcher, Institute for Multiphase Processes, Leibniz University Hannover, An der Universität 1, Garbsen, Germany, 30823 **E-mail:** shalinaaleksandra@gmail.com, hubenia@imp.uni-hannover.de

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8212-3455>

Sara Leal-Marin, Doctor of Engineering, Postdoctoral Researcher, Institute for Multiphase Processes, Leibniz University Hannover, An der Universität 1, Garbsen, Germany, 30823

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0315-1950>

Наталія Анатоліївна Труфанова, кандидат біологічних наук, відділ кріобіохімії, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна, 61016

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8718-7490>

Євген Генадійович Іванов, доктор біологічних наук, доцент, Кафедра молекулярної біології та біотехнології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61022, Україна **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5146-2705>

Birgit Glasmacher, Doctor of Engineering, Professor, Institute for Multiphase Processes, Leibniz University Hannover, An der Universität 1, Garbsen, Germany, 30823

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2452-1666>

Олександр Юрійович Петренко, Доктор біологічних наук, професор, Відділ кріобіохімії, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна, 61016

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9554-8639>

**Corresponding author: Oleksandra Hubenia, e-mail: shalinaaleksandra@gmail.com, hubenia@imp.uni-hannover.de*