

УДК 611.36.013:615.014.41

М.В. Останков, Л.А. Леонова, Н.А. Бондарович*, Л.В. Останкова, А.Н. Гольцев

Влияние условий криоконсервирования на фенотипический профиль и иммуномодулирующую активность клеток фетальной печени

UDC 611.36.013:615.014.41

M.V. Ostankov, L.A. Leonova, M.A. Bondarovich*, L.V. Ostankova, A.M. Goltsev

Effect of Cryopreservation Conditions on Phenotypic Profile and Immunomodulating Activity of Fetal Liver Cells

Реферат: Исследовано влияние условий криоконсервирования (концентрация криопротектора диметилсульфоксида – ДМСО, скорость охлаждения в различных температурных интервалах) на фенотипический профиль и иммуномодулирующую активность клеток фетальной печени (КФП) крыс 14 суток гестации. Клетки замораживали по двум режимам под защитой 7,5; 10 и 12,5% ДМСО. Определяли фенотипический профиль КФП (CD34⁺CD38⁻, Sca-1⁺CD34⁻, Sca-1⁺CD34⁺, CD44⁻CD73⁺, CD44⁺CD73⁺), их цитоморфологические показатели, количество и жизнеспособность. Разработанный в данной работе режим криоконсервирования КФП обеспечивал сохранность в гетерогенной популяции клеток с иммуномодулирующей активностью, которую оценивали в системе *in vivo* на модели экспериментального atopического дерматита (ЭАД). Экспериментально установлена эффективность применения криоконсервированных КФП по режиму 1 (1 град/мин до –25°C; 5-минутная стабилизация при –25°C и погружение в жидкий азот) с 10% ДМСО для восстановления показателей крови и снижения интенсивности кожных воспалительных реакций у крыс с индукцией ЭАД.

Ключевые слова: криоконсервирование, ДМСО, клетки фетальной печени крысы, иммуномодулирующая активность, atopический дерматит.

Реферат: Досліджено вплив умов криоконсервування (концентрація криопротектору диметилсульфоксиду – ДМСО, швидкість охолодження в різних температурних інтервалах) на фенотипічний профіль та імуномодулюючу активність клітин фетальної печінки (КФП) щурів 14 діб гестації. Клітини заморожували за двома режимами під захистом 7,5; 10 і 12,5% ДМСО. Визначали фенотипічний профіль КФП (CD34⁺CD38⁻, Sca-1⁺CD34⁻, Sca-1⁺CD34⁺, CD44⁻CD73⁺, CD44⁺CD73⁺), їх цитоморфологічні показники, кількість та життєздатність. Розроблений у даній роботі режим криоконсервування КФП забезпечував збереження в гетерогенній популяції клітини з імуномодулюючою активністю, яку оцінювали в системі *in vivo* на моделі експериментального atopічного дерматиту (ЕАД). Експериментально встановлено ефективність застосування криоконсервованих КФП за режимом 1 (1 град/хв до –25°C; 5-хвилинна стабілізація при –25°C і занурення в рідкий азот) з 10% ДМСО для відновлення показників крові та зниження інтенсивності шкірних запальних реакцій у щурів із індукцією ЕАД.

Ключові слова: криоконсервування, ДМСО, клітини фетальної печінки щура, імуномодулююча активність, atopічний дерматит.

Abstract: The effect of cryopreservation conditions (concentration of dimethyl sulfoxide cryoprotectant, cooling rate in different temperature ranges) on phenotypic profile and immunomodulating activity of rat fetal liver cells (FLCs) of 14 days of gestation was investigated. The cells were frozen according to two regimens under protection of 7.5; 10, and 12.5% dimethyl sulfoxide. We evaluated the phenotypic profile of FLCs (CD34⁺CD38⁻, Sca-1⁺CD34⁻, Sca-1⁺CD34⁺, CD44⁻CD73⁺, CD44⁺CD73⁺), their cytomorphological indices, number and viability. The FLCs cryopreservation regimen developed in this work provided the preservation in a heterogeneous cell population with immunomodulating activity, evaluated *in vivo* in the model of experimental atop dermatitis (EAD). The efficiency of using FLCs cryopreserved according to the regimen 1 (1 deg/min to –25°C; stabilization at –25°C for 5 min and plunging into liquid nitrogen) with 10% DMSO to restore blood counts and reduce the intensity of dermal inflammatory reactions in rats with the induced EAD was experimentally established.

Key words: cryopreservation, DMSO, rat fetal liver cells, immunomodulating activity, atop dermatitis.

Одна из актуальных задач криобиологии, имеющих как теоретическое, так и прикладное значение – исследование процессов, протекающих на разных этапах криоконсервирования клеточных суспензий [1, 3, 12]. Это обусловлено необходимостью разработки оптимального режима криоконсервирования, обеспечивающего сохра-

The study of the processes occurring at different stages of cell suspension cryopreservation is one of urgent tasks of cryobiology, having both theoretical and applied values [1, 5, 23]. This is due to the necessity to develop an optimal cryopreservation regimen, providing preservation of structural organization and functional activity of different cells [7, 10, 18, 21].

Відділ криопатофізіології і імунології, Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryopathophysiology and Immunology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: cryopato@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: cryopato@gmail.com

Надійшла 20.02.2019
Прийнята до друку 03.09.2019

Received February, 20, 2019
Accepted September, 03, 2019

© 2019 M.A. Bondarovich, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

нение структурной организации и функциональной активности различных клеток [5, 9, 21, 23].

Весьма проблемной является разработка оптимальных условий криоконсервирования клеточных суспензий, представляющих собой гетерогенную клеточную популяцию, каждый из элементов которой реализует специфическую функцию, обеспечивая интегральный потенциал определенной биологической структуры [3, 8]. В этой связи важна минимизация внутриклеточной кристаллизации [2, 6]. В то же время необходимо учитывать процесс внеклеточной кристаллизации, вследствие которой при замораживании клетки вытесняются в межкристаллические участки, преимущественно содержащие раствор криопротектора [6], что снижает жизнеспособность клеток после замораживания-оттаивания.

В настоящее время разработаны способы криоконсервирования кроветворных клеток разного генеза [2, 3, 14, 17]. Преимущественно при этих способах в качестве криопротектора используется диметилсульфоксид (ДМСО) [3, 12, 17]. Для криоконсервирования гемопоэтических клеток костного мозга оптимальными являются режимы, предусматривающие низкие скорости охлаждения с использованием 10% ДМСО [5, 11].

К числу гемопоэтических тканей относятся клетки фетальной печени (КФП) [7, 13], которые широко применяются в клеточной терапии и, в частности, регенеративной медицине [7, 13, 24]. При этом обязательным этапом их подготовки к клиническому применению является криоконсервирование [2, 3, 25].

Доказано, что эффективность действия КФП обусловлена присутствием в них широкого спектра клеточных популяций, среди которых основную роль играют гемопоэтические (ГСК) и мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [7, 18]. Среди ГСК наименее дифференцированной считается субпопуляция Sca-1⁺CD34⁻-клеток. При дифференцировке на поверхности этих клеток появляется CD34-молекула, вследствие чего формируется пул краткосрочной популяции ГСК (Sca-1⁺CD34⁺) [18]. Одним из наиболее характерных фенотипических маркеров МСК в общем пуле КФП является CD73-молекула, тогда как наличие CD44-молекулы характеризует их дифференцированное состояние [15]. Интегральный функциональный потенциал КФП во многом определяется продукцией регуляторных пептидов, которые оптимизируют процессы регенерации в органах и тканях, обладают иммуномодулирующей активностью и, как правило, не

Development of optimal conditions of cell suspension cryopreservation, being of heterogeneous cell population is extremely problematic. Each element of population has a specific function, providing the integral potential of a certain biological structure [5, 9]. Herewith minimization of intracellular crystallization is important [4, 8]. At the same time, it is also necessary to take into account an extracellular crystallization, due to which, during freezing, the cells are pushed to inter-crystalline areas, mainly containing a cryoprotectant solution [8], reducing the cell viability after freeze-thawing.

Nowadays there have been developed the cryopreservation methods for hematopoietic cells of different genesis [3, 4, 5, 14]. These methods mostly use dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant [5, 14, 23]. Regimens providing low cooling rates using 10% DMSO are optimal for cryopreservation of hematopoietic bone marrow cells [7, 11, 19].

Hematopoietic tissues include the fetal liver cells (FLCs) [2, 11], which are widely used in cell therapy and, in particular, regenerative medicine [2, 11, 22]. At the same time, cryopreservation is a mandatory step in preparation of FLCs for clinical use [4, 5, 25].

It has been proven that the efficiency of FLCs is stipulated by the presence of a wide range of cell populations in them, among which the main role is played by hematopoietic (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) [11, 15]. Subpopulation of Sca-1⁺CD34⁺ cells is the least differentiated among HSCs. During differentiation, a CD34-molecule appears on the surface of these cells, as a result of which a pool of a short-term HSC population (Sca-1⁺CD34⁺) is formed [15]. CD73-molecule is one of the most characteristic phenotypic markers of MSCs in a total pool of FLCs, while CD44-molecule characterizes their differentiated state [12]. The integral functional potential of FLCs is largely determined by the production of regulatory peptides that optimize regeneration processes in organs and tissues, possess immunomodulating activity and, as a rule, do not cause the development of allergic reactions after administration [2].

Previously we have shown [5, 6] that, after cryopreservation the FLCs preserve immunomodulating activity evaluated in model systems. In this work, the ability of cryopreserved FLCs to correct the immune system (IS) of the recipient's organism was tested during the induction of experimental atopic dermatitis (EAD).

The research aim was to evaluate the effect of various cryopreservation conditions on phenotypic

вызывают после введения развития аллергических реакций [13].

Ранее нами было показано [3, 4], что после криоконсервирования КФП сохраняют иммуномодулирующую активность, оцененную в модельных системах. В данной работе способность криоконсервированных КФП корректировать иммунную систему (ИС) организма реципиента была апробирована при индукции экспериментального атопического дерматита (ЭАД).

Цель работы – оценить влияние различных условий криоконсервирования на фенотипический профиль и цитоморфологические показатели клеток фетальной печени, а также на их способность восстанавливать показатели крови и снижать интенсивность кожных воспалительных реакций у крыс при лечении экспериментального атопического дерматита.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 6-месячных крысах-самках линии Вистар массой 180–200 г согласно Закону Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447-IV от 21.02.2006 г.) с соблюдением требований Комитета по биоэтике Института, согласованных с положением «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986).

Суспензию КФП крыс 14 суток гестации получали путем диссоциации в гомогенизаторе Поттера в питательной среде 199 («Пан Эко», Россия) с 3%-й эмбриональной телячьей сывороткой («БиолоТ», Россия) и 2%-м цитратом натрия (рабочий раствор). Этот же рабочий раствор использовали на этапах замораживания клеток. Экспозицию КФП с криопротектором ДМСО в концентрации 7,5; 10; 12,5% проводили в течение 5 мин при температуре 4°C. Криоконсервировали КФП в полиэтиленовых ампулах («Nunc», Германия) в объеме 1 мл на программном замораживателе УОП-06 (СКТБ с ОП при ИПКиК НАН Украины). Были использованы ступенчатые режимы замораживания с разными скоростями охлаждения: режим 1 – 1 град/мин до –25°C, 5-минутная стабилизация при –25°C и погружение в жидкий азот; режим 2 – 1 град/мин до –40°C, 5-минутная стабилизация при –40°C, 10 град/мин до –90°C и погружение в жидкий азот. Оттаивание образцов осуществляли на водяной бане при 41°C в течение 1–3 мин до исчезновения твердой фазы. После размораживания суспензию клеток отмывали от криопротектора в рабочем растворе, центрифугировали при 300g в течение 10 мин.

profile and cytomorphological parameters of fetal liver cells, as well as their ability to restore the blood counts and reduce the intensity of skin inflammatory reactions in rats during treatment of experimental atopic dermatitis.

Materials and methods

All the experiments were performed in female Wistar rats of 6 months age of 180–200 g in accordance with the Law of Ukraine ‘On the Protection of Animals against Cruelty’ (N 3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, agreed with the provisions of the ‘European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes’ (Strasbourg, 1986).

Suspension of rat FLCs of 14 gestation days was obtained by dissociation with a Potter homogenizer in nutrient medium 199 (PanEko, Russia) with 3% fetal bovine serum (Biolot, Russia) and 2% sodium citrate (handling solution). The same handling solution was used at the stages of cell freezing. FLCs with 7.5; 10; 12.5% DMSO cryoprotectant were exposed for 5 min at 4°C. FLCs were cooled in 1 ml polyethylene ampoules (Nunc, Germany) with a programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine). The stepwise freezing regimens with different cooling rates were used: regimen 1 – 1 deg/min down to –25°C, 5-minute stabilization at –25°C and plunging into liquid nitrogen; regimen 2 – 1 deg/min down to –40°C, 5-minute stabilization at –40°C, 10 deg/min down to –90°C and plunging into liquid nitrogen. The samples were warmed in a water bath at 41°C for 1–3 min until a solid phase disappeared. After thawing, the cell suspension was washed from cryoprotectant with a handling solution, centrifuged at 300g for 10 min.

FLC suspension was assessed for a number of nucleated cells (in Goryaev’s chamber), viability (using supravital staining with trypan blue (TB) and propidium iodide (PI)) prior to and after freeze-thawing [17]. Morphological composition of FLCs was evaluated in smears stained with azure II-eosin according to Romanovsky, using a Primo Star light microscope (Carl Zeiss, Germany); ocular ×10, objective ×90 (oil immersion) by counting 500 cells. The content of all cell types was expressed as a percentage. Subpopulation composition of FLCs



В суспензии КФП до и после замораживания-оттаивания определяли количество ядросодержащих клеток (в камере Горяева), жизнеспособность (методом суправитального окрашивания трипановым синим (ТС) и пропидием йодида (PI)) [20]. Морфологический состав КФП оценивали на мазках-отпечатках, окрашенных азур II-эозином по Романовскому, с помощью светового микроскопа «Primo Star» («Carl Zeiss», Германия); окуляр $\times 10$, объектив $\times 90$ (масляная иммерсия) путем подсчета 500 клеток. Содержание всех типов клеток выражали в процентах. Субпопуляционный состав КФП оценивали на цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США) с использованием моноклональных антител к CD34, CD38, CD44, CD73, Sca-1 молекулам («BD», США). Результаты обрабатывали с помощью программы «Win MDI 2.9» («TSRI», США).

Экспериментальных животных разделили на группы: 1 – контроль (здоровые), 2 – с индукцией ЭАД; 3 – с введением свежeweделенных КФП (5×10^6 кл/крысу); 4 – с введением криоконсервированных КФП (5×10^6 кл/крысу).

Свежeweделенные (сКФП) и криоконсервированные (кКФП) КФП вводили на 22-е сутки после индукции ЭАД внутрибрюшинно однократно в объеме 0,5 мл с концентрацией клеток 5×10^6 . Инициировали ЭАД втиранием в кожу 5%-го спиртово-ацетонового раствора динитрохлорбензола в течение 21 суток [10]. Терапевтический эффект от введения кКФП крысам с ЭАД оценивали на 5-е сутки по характеру восстановления показателей крови и снижению интенсивности кожных воспалительных реакций. Для выявления иммунных нарушений на локальном уровне проводили иммунофенотипирование клеток кожного инфильтрата на проточном цитофлуорометре «FACS Calibur» («BD») с применением моноклональных антител к молекулам CD3, CD4, CD8, CD25 («BD»). По соотношению CD4/CD8 вычисляли иммунорегуляторный индекс (ИРИ).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методу Стьюдента-Фишера с применением программы «Statistica 7.0» («Stat Soft Inc.», США).

Результаты и обсуждение

Немаловажным при криоконсервировании для обеспечения сохранности клеточных суспензий является использование криопротектора. Наиболее широко используемым для этих целей криозащитным соединением является ДМСО. Тем не менее наряду с обеспечением криорезистентности клеткам он проявляет токсические свойства

was evaluated with FACS Calibur cytofluorimeter (BD, USA) using monoclonal antibodies to CD34, CD38, CD44, CD73, Sca-1 molecules (BD, USA). The results were processed using WinMDI 2.9 software (TSRI, USA).

Experimental animals were divided into the following groups: 1 – control (healthy); 2 – with EAD induction; 3 – with introduction of freshly isolated FLCs (5×10^6 cells/rat); 4 – with introduction of cryopreserved FLCs (5×10^6 cells/rat).

Freshly isolated (fFLCs) and cryopreserved (cFLCs) FLCs were administered as a single-dose intraperitoneally in the volume of 0.5 ml with a cell concentration of 5×10^6 on the 22nd day after EAD induction. EAD was initiated by infraction onto the skin of 5% alcohol-acetone solution of dinitrochlorobenzene for 21 days [24]. Therapeutic effect after administering FLCs to the rats with EAD was evaluated to the 5th day by the nature of restoration of blood counts and a decrease in intensity of dermal inflammatory reactions. To identify immune disorders immunophenotyping of skin infiltrate cells was performed with FACS Calibur (BD) flow cytofluorimeter using monoclonal antibodies to CD3, CD4, CD8, CD25 (BD) molecules. Immunoregulatory index (IRI) was calculated by CD4/CD8 ratio.

Experimental data were statistically processed with Student-Fisher's method using Statistica 7.0 software (Stat Soft Inc., USA).

Results and discussion

During cryopreservation the use of cryoprotectant is important to provide survival of cell suspensions. DMSO is the most widely used cryoprotective compound for these purposes. Nevertheless, along with providing a cryoresistance to cells, it exhibits toxic properties [1, 20]. Thus, selection of optimal concentration of this cryoprotectant is one of the important factors determining the effectiveness of cryopreservation [4, 7]. Thus we have carried out a study of the effect of FLC exposure with 12.5% DMSO on the integrity, structure and cytomorphological characteristics. So, after dissociation of liver and obtaining the FLC suspension (control), the viability was (79.00 ± 3.00)% by TB staining and (73.00 ± 4.00)% when using PI. The FLC viability indices after exposure with DMSO did not significantly change.

The morphological composition of the control FLC samples was presented by undifferentiated blasts (8.71 ± 1.24)%; erythroid immature cells (75.42 ± 5.87)%, (45.35 ± 3.04)% of which were normoblasts; myeloblasts (2.81 ± 0.86)%, immature (1.15 ± 0.24)% and mature (1.92 ± 0.84)% granulocytes;

[1, 22]. Таким образом, подбор оптимальной концентрации данного криопротектора является одним из важных факторов, определяющих эффективность криоконсервирования [2, 5]. В связи с этим было проведено исследование влияния экспозиции КФП с ДМСО в предполагаемой для использования концентрации 12,5% на сохранность, структуру и цитоморфологические характеристики. Так, после диссоциации печени и получения суспензии КФП (контроль) жизнеспособность составляла $(79,00 \pm 3,00)\%$ по окрашиванию ТС и $(73,00 \pm 4,00)\%$ при использовании PI. Показатели жизнеспособности КФП после экспозиции с ДМСО значимо не изменялись.

Морфологический состав контрольных образцов КФП представлен: недифференцированными бластами $((8,71 \pm 1,24)\%)$; незрелыми клетками эритроидного ряда $((75,42 \pm 5,87)\%)$, из которых $(45,35 \pm 3,04)\%$ – нормобласты; миелобластами $((2,81 \pm 0,86)\%)$, незрелыми $((1,15 \pm 0,24)\%)$ и зрелыми $((1,92 \pm 0,84)\%)$ гранулоцитами; моноцитами $((2 \pm 0,48)\%)$; лимфоцитами $((1,25 \pm 0,01)\%)$ и гепатоцитами $((7,00 \pm 0,56)\%)$. Эти данные были взяты за 100% (табл. 1). При оценке КФП после экспозиции с ДМСО существенных изменений выявлено не было.

При оценке показателей субпопуляционного состава КФП после диссоциации и экспозиции с ДМСО значимых различий не установ-

monocytes $(2 \pm 0.48)\%$; lymphocytes $(1.25 \pm 0.01)\%$ and hepatocytes $(7.00 \pm 0.56)\%$. These data were assumed as 100% (Table 1). Assessing the FLCs after exposure with DMSO did not revealed any significant changes.

When assessing the indices of subpopulation composition of FLCs after dissociation and exposure with DMSO, no significant differences were found. Among HSCs, the relative content of differentiated $CD34^+Sca-1^+$ cells made 0.45%, undifferentiated with $CD34^+Sca-1^+$ and $CD34^+CD38^-$ profile it was 0.23 and 0.04%, respectively. The number of MSCs with $CD44^+CD73^+$ and $CD44^+CD73^+$ phenotype was 12.45 and 5.25%, respectively.

Viability indices, morphological and subpopulation composition of FLCs did not significantly differ from those when comparing freshly isolated samples and exposed with cryoprotectant cells. This enabled to conclude that 12.5% DMSO did not toxically affect the integrity and cytomorphological indices of FLCs.

At the next stage of the research the FLCs were cryopreserved according to the regimens 1 and 2 to enrich the suspension with cell population having immunomodulating activity. There were examined 7.5; 10; 12.5% concentrations of DMSO differently affecting the number, viability and phenotypic characteristics of cells during freeze-thawing. The FLC viability was shown to

Таблица 1. Морфологический состав КФП, криоконсервированных по режиму 1
Table 1. Morphological composition of FLCs cryopreserved according to regimen 1

Клеточный состав Cell composition	КФП, % FLCs, %	кКФП + ДМСО, % сFLCs + DMSO, %		
		7,5%	10%	12,5%
Недифференцированные бласты Undifferentiated blasts	$8,72 \pm 1,24$	$10,53 \pm 1,24^*$	$13,84 \pm 1,22^*$	$8,04 \pm 0,63$
Эритробласты Erythroblasts	$29,05 \pm 2,83$	$23,03 \pm 1,83^*$	$28,03 \pm 2,06$	$20,08 \pm 1,32^*$
Нормобласты Normoblasts	$46,37 \pm 3,04$	$63,41 \pm 4,35^*$	$53,42 \pm 6,13^*$	$70,75 \pm 6,68^*$
Миелобласты Myeloblasts	$2,81 \pm 0,86$	$0,24 \pm 0,01^*$	$1,21 \pm 0,01^*$	–
Зрелые гранулоциты Mature granulocytes	$1,65 \pm 0,84$	–	–	–
Незрелые гранулоциты Immature granulocytes	$1,15 \pm 0,24$	–	–	–
Моноциты Monocytes	$2,00 \pm 0,48$	$0,75 \pm 0,03^*$	$1,26 \pm 0,01^*$	–
Лимфоциты Lymphocytes	$1,25 \pm 0,01$	$2,18 \pm 0,31^*$	$2,24 \pm 0,43^*$	$1,32 \pm 0,27$
Гепатоциты Hepatocytes	$7,00 \pm 0,56$	–	–	–

Примечание: * – отличия значимы по сравнению со свежeweделенными КФП ($p < 0,05$).

Note: * – differences are significant if compared with freshly isolated FLCs, $p < 0.05$.



лено. Среди ГСК относительное содержание дифференцированных CD34⁺Sca-1⁺ клеток составило 0,45%, недифференцированных с маркерами CD34⁺Sca-1⁺ и CD34⁺CD38⁻ – 0,23 и 0,04% соответственно. Количество МСК с фенотипом CD44⁺CD73⁺ и CD44⁺CD73⁻ было 12,45 и 5,25% соответственно.

Показатели жизнеспособности, морфологический и субпопуляционный состав КФП статистически значимо не отличались от таковых при сравнении свежесыведенных и экспонированных с криопротектором образцов. Это позволило сделать вывод, что ДМСО в концентрации 12,5% не оказывает токсического действия на сохранность и цитоморфологические показатели КФП.

На следующем этапе работы было проведено криоконсервирование КФП по режимам 1 и 2 с целью обогащения суспензии популяцией клеток с иммуномодулирующей активностью. Были апробированы концентрации ДМСО 7,5; 10; 12,5%, которые в разной степени влияли на количество, жизнеспособность и фенотипические характеристики клеток в процессе замораживания-оттаивания. Показано, что жизнеспособность кКФП значимо снижалась в разной степени и зависела от концентрации ДМСО и применяемого режима замораживания. Очевидно, это связано с действием физико-химических факторов криоконсервирования [1, 6]. Поэтому разработка научно обоснованных режимов криоконсервирования для клеток различных тканей возможна только с учетом процессов массообмена в системе клетка-окружающая среда на разных этапах криоконсервирования. Вследствие фазового перехода вода-лед, являющегося неотъемлемым этапом технологического процесса криоконсервирования клеточных суспензий, возникают повреждающие факторы, в частности дегидратация и внутриклеточная кристаллизация [6]. Оптимальная скорость охлаждения, специфичная для конкретного типа клеток, обеспечивает баланс трансмембранного массообмена клетка-окружающая среда, в результате которого обезвоживание клеток, с одной стороны, достаточно для исключения вероятности внутриклеточного льдообразования, а с другой – не достигает критического уровня, чтобы привести к неизбежному повреждению клеток. Существенную роль в этом процессе играют концентрация криопротектора, а также особенности строения плазматических мембран клеток, лимитирующих водный поток [1].

Максимально высокое количество и показатель жизнеспособности клеток были получены

be significantly decreased to different extent and to be depended on DMSO concentration and the applied freezing regimen. Obviously, this is associated with the action of physicochemical factors of cryopreservation [1, 8]. Therefore, the development of scientifically based cryopreservation regimens for cells of different tissues is possible only taking into account the processes of mass transfer in 'cell-environment' system at different

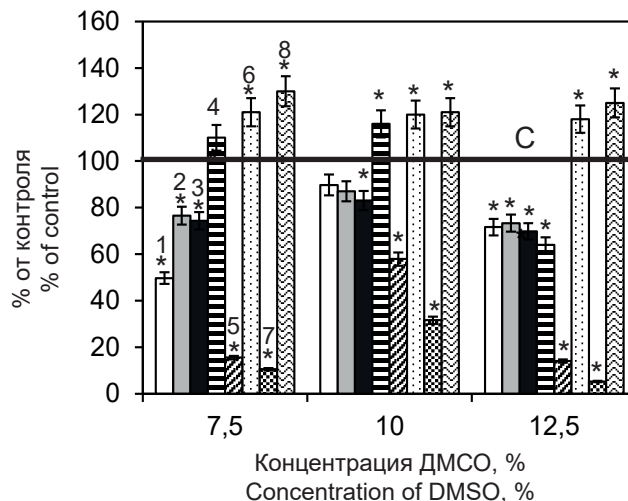


Рис. 1. Показатели фенотипического профиля и сохранности КФП, криоконсервированных по режиму 1. 1 – количество ядродержащих клеток; 2 – жизнеспособность клеток по ТС; 3 – жизнеспособность клеток по PI; 4 – содержание клеток CD34⁺CD38⁻; 5 – содержание клеток CD44⁺CD73⁺; 6 – содержание клеток CD73⁺CD44⁻; 7 – содержание клеток Sca-1⁺CD34⁻; 8 – содержание клеток Sca-1⁺CD34⁺. За 100% приняты значения КФП после диссоциации (контроль, С); * – отличия значимы по сравнению с показателями контроля ($p < 0,05$).

Fig. 1. Indices of phenotypic profile and integrity of FLCs cryopreserved according to regimen 1. 1 – number of nucleated cells; 2 – cell viability by TB; 3 – cell viability by PI; 4 – CD34⁺CD38⁻ cell content; 5 – CD44⁺CD73⁺ cell content; 6 – CD73⁺CD44⁻ cell content; 7 – Sca-1⁺CD34⁻ cell content; 8 – Sca-1⁺CD34⁺ cell content. FLC values after dissociation are assumed as 100% (control, C); * – differences are significantly significant if compared with the control indices ($p < 0.05$).

cryopreservation stages. Due to water-ice phase transition, being an integral step in the technological process of cell suspension cryopreservation, damaging factors arise, in particular, dehydration and intracellular crystallization [8]. The optimal cooling rate, specific for a particular type of cell, provides a balance of cell-environment transmembrane mass transfer, as a result of which the dehydration of cells, on the one hand, is sufficient to exclude the possibility of intracellular ice formation, and on an other hand, does not reach a critical level to lead to unavoidable cell damage. Cryoprotectant concentration, as well as structural

при криоконсервировании КФП по режиму 1 под защитой 10% ДМСО (рис. 1). При изучении морфологического состава КФП, криоконсервированных по режиму 1, отмечены повышенное содержание недифференцированных бластов, эритро- и нормобластов, лимфоцитов при сравнении с контролем и отсутствие гранулоцитов и гепатоцитов (табл. 1).

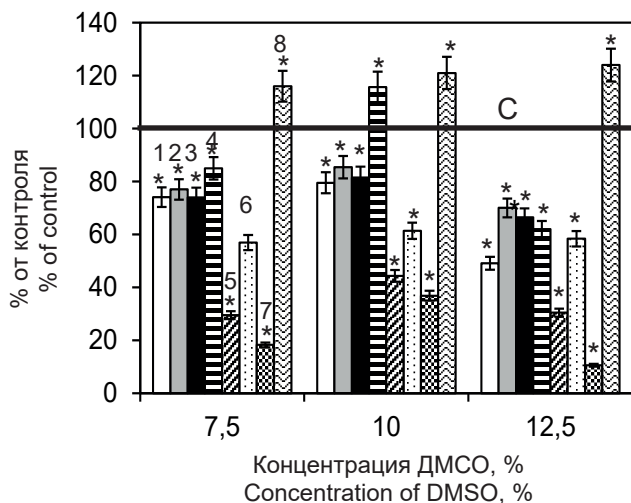


Рис. 2. Показатели фенотипического профиля и сохранности КФП, криоконсервированных по режиму 2. 1 – количество ядросодержащих клеток; 2 – жизнеспособность клеток по ТС; 3 – жизнеспособность клеток по PI; 4 – содержание клеток CD34⁺CD38⁻; 5 – содержание клеток CD44⁺CD73⁺; 6 – содержание клеток CD73⁺CD44⁻; 7 – содержание клеток Sca-1⁺CD34⁺; 8 – содержание клеток Sca-1⁺CD34⁻. За 100% приняты значения КФП после диссоциации (контроль, С); * – отличия значимы по сравнению с показателями контроля ($p < 0,05$).

Fig. 2. Indices of phenotypic profile and integrity of FLCs cryopreserved according to regimen 2. 1 – number of nucleated cells; 2 – cell viability by TB; 3 – cell viability by PI; 4 – CD34⁺CD38⁻ cell content; 5 – CD44⁺CD73⁺ cell content; 6 – CD73⁺CD44⁻ cell content; 7 – Sca-1⁺CD34⁺ cell content; 8 – Sca-1⁺CD34⁻ cell content. FLC values after dissociation are assumed as 100% (control, C); * – differences are significantly significant if compared with the control indices ($p < 0.05$).

В субпопуляционном составе КФП, криоконсервированных по режиму 1 с 7,5 и 10% ДМСО, наблюдали значимое увеличение содержания ГСК (CD34⁺CD38⁻) на 10 и 16% соответственно. Использование 10%-й концентрации ДМСО в большей степени обеспечивало сохранность ГСК Sca-1⁺CD34⁺ (31,58)% и МСК CD44⁺CD73⁺ (57,87 ± 3,67)% от контроля (рис. 2). По мнению А. Humpe и соавт. [16], чувствительность CD34⁺CD38⁻ и CD44⁺CD73⁺-клеток к влиянию концентрации криопротектора может быть связана с различным содержанием липидов и протеинов в клеточных мембранах.

features of plasma membranes of cells, limiting the water flow play a significant role in this process [1].

The highest number and cell viability index was obtained during cryopreservation of FLCs according to regimen 1 under the protection of 10% DMSO (Fig. 1). When studying the morphological composition of FLCs cryopreserved according to regimen 1, an increased content of undifferentiated blasts, erythro- and normoblasts, lymphocytes if compared with the control and no granulocytes and hepatocytes were noted (Table 1).

In subpopulation composition of FLCs cryopreserved according to regimen 1 with 7.5 and 10% DMSO, a significant increase of HSCs (CD34⁺CD38⁻) content was observed by 10 and 16%, respectively. The using of 10% DMSO more provides integrity of HSCs Sca-1⁺CD34⁺ (31.58)% and MSCs CD44⁺CD73⁺ (57.87 ± 3.67)% of the control (Fig. 2). According to Humpe A. *et al.* [13], sensitivity of CD34⁺CD38⁻ and CD44⁺CD73⁺ cells to the effect of cryoprotectant concentration can be associated with different contents of lipids and proteins in cell membranes.

During cryopreservation of FLCs by regimen 2, higher integrity and viability indices of nucleated cells were also obtained using 10% DMSO.

Analysis of morphological composition of FLCs cryopreserved according to regimen 2 also showed an increased content of undifferentiated blasts, normoblasts, no granulocytes and a significant decrease in the number of lymphocytes and monocytes (Table 2).

In subpopulation composition of the FLCs frozen by regimen 2, the highest number of CD34⁺CD38⁻ and CD44⁺CD73⁺ cells was obtained using 10% DMSO ((115.67 ± 9.54) and (44.3 ± 3.51)%, respectively if compared to the control). However, under this preservation regimen, the content of these cells was lower than when using regimen 1 (Fig. 2).

It should be noted that irrespective of cryopreservation regimen, undifferentiated blasts and normoblasts were the most cryostable, the granulocytes, monocytes, and hepatocytes were less stable. This fact is associated with the structural features of FLCs, confirmed by the results of other researchers [18]. In subpopulation composition of cFLCs, the CD34⁺CD38⁻ cells are the most resistant to the action of cryopreservation factors, and Sca-1⁺CD34⁺ cells are the least resistant.

Thus, a comparative assessment of phenotypic profile of FLCs enabled to establish its change when varying cooling rates and cryoprotectant concentrations that is consistent with the data of other researchers [16, 23].

При криоконсервировании КФП по режиму 2 более высокие показатели сохранности и жизнеспособности ядросодержащих клеток были получены также в случае использования 10%-й концентрации ДМСО.

Анализ морфологического состава КФП, криоконсервированных по режиму 2, также показал повышенное содержание недифференцированных бластов, нормобластов, отсутствие гранулоцитов и значимое снижение количества лимфоцитов и моноцитов (табл. 2).

Considering that implementation of FLC function *in vivo* is the only criterion for evaluating the effectiveness of therapy, the studies of immunomodulating activity of FLCs cryopreserved according to regimen 1 with 10% DMSO have been carried out.

Therefore, in the rats with EAD after administration of FLCs, a decrease in leukocytosis and content of monocytic and phagocytic elements in blood was noted, indicating a decrease in inflammatory reaction severity (Table 3).

Таблица 2. Морфологический состав КФП, криоконсервированных по режиму 2
Table 2. Morphological composition of FLCs cryopreserved according to regimen 2

Клеточный состав Cell composition	КФП, % FLCs, %	кКФП + ДМСО, % cFLCs + DMSO, %		
		7,5%	10%	12,5%
Недифференцированные бласты Undifferentiated blasts	8,72 ± 1,24	10,36 ± 1,18*	12,43 ± 1,37*	11,43 ± 1,59*
Эритробласты Erythroblasts	29,05 ± 2,83	31,01 ± 3,28	31,57 ± 2,6	25,74 ± 2,43
Нормобласты Normoblasts	46,37 ± 3,04	57,14 ± 5,23*	53,65 ± 5,97*	62,15 ± 6,57*
Миелобласты Myeloblasts	2,81 ± 0,86	–	0,44 ± 0,02	–
Зрелые гранулоциты Mature granulocytes	1,65 ± 0,84	–	–	–
Незрелые гранулоциты Immature granulocytes	1,15 ± 0,24	–	–	–
Моноциты Monocytes	2,00 ± 0,48	1,03 ± 0,042*	1,06 ± 0,013*	–
Лимфоциты Lymphocytes	1,25 ± 0,01	0,46 ± 0,06*	0,85 ± 0,04*	0,68 ± 0,07*
Гепатоциты Hepatocytes	7,00 ± 0,56	–	–	–

Примечание: * – отличия значимы по сравнению со свежесыведенными КФП ($p < 0,05$).

Note: * – differences are significant if compared with freshly isolated FLCs, $p < 0.05$.

В субпопуляционном составе кКФП, замороженных по режиму 2, наибольшее количество CD34⁺CD38⁻ и CD44⁺CD73⁺-клеток было получено с применением 10% ДМСО ((115,67 ± 9,54) и (44,3 ± 3,51)% соответственно по сравнению с контролем). Однако при данном режиме криоконсервирования содержание этих клеток было ниже, чем при использовании режима 1 (рис. 2).

Следует отметить, что независимо от режима криоконсервирования наиболее криостабильными были недифференцированные бласты и нормобласты, менее устойчивыми – гранулоциты, моноциты и гепатоциты. Данный факт связан с особенностями структуры КФП, что подтверждается результатами других исследователей [21]. В субпопуляционном составе кКФП к действию факторов криоконсервирования наиболее устойчивы CD34⁺CD38⁻-клетки, а наименее – Sca-1⁺CD34⁻-клетки.

An increase of T-regulatory cells (CD4⁺CD25⁺) number, population of T-helper cells (CD4⁺) and T suppressors/cytotoxic (CD8⁺) was observed in cellular infiltrate of rat dermal inflammation with introduction of cFLCs, that contributed to normalization of IRI (Table 4).

The results of this study confirmed the basic postulates of cryobiology: the nature and degree of the effect of freezing factors depend on an initial state of cells, as well as cryopreservation regimen. In addition, it is necessary to take into account the processes, occurring in cells during freeze-thawing, associated with phase transformations in cryoprotective solutions.

Cryopreservation of FLCs by regimen 1 under protection of 10% DMSO maximally provided preservation in a heterogeneous population of cells with immunomodulating activity, confirmed by the results of the studies showing the



Таким образом, сравнительная оценка фенотипического профиля КФП позволила установить его изменение при варьировании скоростей охлаждения и концентрации криопротектора, что согласуется с данными других исследователей [12, 19].

Учитывая, что реализация функции кКФП в условиях *in vivo* является единственным критерием оценки эффективности проводимой терапии, были проведены исследования иммуномодулирующей активности КФП, криоконсервированных по режиму 1 с 10% ДМСО.

Так, у крыс с ЭАД после введения кКФП отмечали снижение лейкоцитоза и содержания моноцитарно-фагоцитарных элементов в крови, что свидетельствует об уменьшении выраженности воспалительной реакции (табл. 3).

В клеточном инфильтрате очага воспаления кожи крыс с введением кКФП наблюдали увеличение количества Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^+$), популяции Т-хелперов ($CD4^+$) и Т супрессоров / цитотоксических ($CD8^+$), что способствовало нормализации ИРИ (табл. 4).

Результаты данного исследования подтвердили основные постулаты криобиологии: характер и степень влияния факторов замораживания зависят от исходного состояния клеток, а также режима криоконсервирования. Кроме того, необходимо учитывать процессы, протекающие в клетках при замораживании-оттаивании, которые связаны с фазовыми превращениями, происходящими в используемых при замораживании криопротекторных растворах.

Таблица 3. Показатели крови крыс с ЭАД и после введения КФП
Table 3. Blood counts of rats with EAD and after introduction of FLCs

Типы клеток Cell types	Группа Group			
	Интакт (контроль) Intact (control)	ЭАД EAD	ЭАД + с/в КФП EAD + fFLCs	ЭАД + кКФП EAD + cFLCs
Бласты Blasts	–	7,0 ± 0,7*	–	–
Ретикулоциты Reticulocytes	–	0,5 ± 0,1*	–	–
Метамиелоциты Metamyelocytes	–	3,0 ± 0,3*	–	–
Базофилы Basophils	1,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3*	0,6 ± 0,1**	0,5 ± 0,1**
Палочко-ядерные нейтрофилы Band neutrophils	3,5 ± 0,3	9,0 ± 0,9*	3,4 ± 0,4 [#]	3,5 ± 0,4 [#]
Сегментно-ядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	24,5 ± 2,3	38,0 ± 3,8*	25,0 ± 2,0 [#]	24,5 ± 2,5 [#]
Моноциты Monocytes	4,5 ± 0,5	12,5 ± 1,3*	3,0 ± 0,8**	3,5 ± 0,2**
Лимфоциты Lymphocytes	66,5 ± 6,7	22,5 ± 0,3*	68,0 ± 3,9 [#]	67,6 ± 6,5 [#]
Большие гранулоцитарные лимфоциты Large granular lymphocyte	–	4,5 ± 0,5*	–	1,0 ± 0,3 [#]

Примечание: отличия значимы по сравнению с показателями контроля (*) и показателями крыс с ЭАД ([#]), $p < 0,05$.

Note: differences are significant if compared with control indices (*) and with indices of rats with EAD ([#]), $p < 0.05$.

preservation of their phenotypic characteristics.

Therapeutic potential of cFLCs was evaluated *in vivo* using an experimental model of EAD. The administration of cFLCs to rats with EAD contributed to restore the blood counts and reduce the intensity of dermal inflammatory reactions.

Таблица 4. Фенотипические характеристики клеточного инфильтрата очага воспаления в коже крыс с ЭАД и после введения КФП

Table 4. Phenotypic characteristics of cell infiltration of inflammation focus in skin of rats with EAD and after introduction of FLCs

Группа Group	Т-лимфоциты ($CD3^+$) T-lymphocytes ($CD3^+$)	Т-хелперы ($CD4^+$) T-helpers ($CD4^+$)	Т-супрессоры / цитотоксические ($CD8^+$) T-suppressors/cytotoxic ($CD8^+$)	Т-регуляторные ($CD4^+CD25^+$) T-regulatory ($CD4^+CD25^+$)	ИРИ IRI
Интакт (контроль) Intact (control)	41,8 ± 4,2	36,4 ± 3,6	28,4 ± 2,8	3,7 ± 0,4	1,28 ± 0,2
ЭАД EAD	19,27 ± 1,8*	14,19 ± 1,4*	6,9 ± 0,7*	0,95 ± 0,4*	2,06 ± 0,21*
ЭАД + сКФП EAD + fFLCs	38,6 ± 3,9 [#]	32,52 ± 3,3 [#]	26,3 ± 2,3 [#]	3,5 ± 0,5 [#]	1,24 ± 1,4 [#]
ЭАД + кКФП EAD + cFLCs	38,81 ± 3,82 [#]	33,35 ± 3,3 [#]	25,0 ± 0,3 [#]	4,2 ± 0,4 [#]	1,33 ± 0,1 [#]

Примечание: отличия значимы по сравнению с показателями контроля (*) и показателями крыс с ЭАД ([#]), $p < 0,05$.

Note: differences are significant if compared with control indices (*) and with indices of rats with EAD ([#]), $p < 0.05$.

Криоконсервирование КФП по режиму 1 под защитой 10% ДМСО обеспечивало сохранность в гетерогенной популяции клеток с иммуномодулирующей активностью, что было подтверждено результатами исследований, показавших сохранность их фенотипических характеристик.

Оценку терапевтического потенциала кКФП проводили в условиях *in vivo*, на экспериментальной модели ЭАД. Введение кКФП крысам с ЭАД способствовало восстановлению показателей крови и снижению интенсивности кожных воспалительных реакций.

Выводы

1. Установлено, что криоконсервирование КФП по режиму 1 под защитой 10% ДМСО максимально обеспечивало сохранность в гетерогенной популяции клеток с иммуномодулирующей активностью.

2. Показано, что введение КФП, криоконсервированных по режиму 1, способствовало восстановлению у крыс с ЭАД показателей крови и кожи.

Литература

1. Белоус АМ, Грищенко ВИ. Криобиология. Киев: Наукова думка; 1994. 432 с.
2. Гольцев АН, Ямпольская ЕЕ, Дубрава ТГ. Идентификация фенотипических характеристик и оценка влияния различных режимов криоконсервирования на функциональный потенциал клеток фетальной печени. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: Біологія. 2006; (4): 121–7.
3. Гольцев АН, Дубрава ТГ, Останкова ЛВ, и др. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации. Проблемы криобиологии. 2009;19(2): 186–99.
4. Гольцев АМ, Бондарович МО, Кузьяков АВ, та ін. Визначення стану Т-клітинної ланки імунітету і вмісту стовбурових ракових клітин як критерій оцінки ефективності превентивної терапії раку молочної залози криоконсервованими клітинами фетальної печінки. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014; 24(3):238–48.
5. Гольцев АН, Гаевская ЮА, Дубрава ТГ, Останкова ЛВ. Влияние криоконсервирования на функциональный статус стволовых кроветворных и мезенхимальных клеток костного мозга при аутоиммунной патологии. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(1): 63–72.
6. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Киев: Наукова думка; 1994. 144 с.
7. Грищенко ВИ, Гольцев АН. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения. Проблемы криобиологии. 2002; 12(1): 54–84.
8. Грищенко ВІ, Петренко ЮО, Скоробогатова НГ, та інш., винахідники; Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб криоконсервування гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини. Патент України № 67587А, 15.06.04.

Conclusions

1. It has been established that cryopreservation of FLCs according to regimen 1 under protection of 10% DMSO maximally provided preservation in a heterogeneous population of cells with immunomodulating activity.

2. It was shown that treatment with introduction of FLCs, preserved according to regimen 1, contributed to the restoration of upregulation of blood counts and dermal indices of rats with EAD.

References

1. Belous AM, Grishenko VI. [Cryobiology]. Kyiv: Naukova Dumka; 1994. 432 p. Russian.
2. Chinnici CM, Pietrosi G, Iannolo G, et al. Mesenchymal stromal cells isolated from human fetal liver release soluble factors with a potential role in liver tissue repair. Differentiation. 2019;105:14–26.
3. Félix OMWO, Tunes G, Ginani VC, et al. The influence of cell concentration at cryopreservation on neutrophil engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation. Hematol Transfus Cell Ther. 2018;40(3):233–9.
4. Goltsev AN, Yampolskaya KY, Dubrava TG. [Identification of phenotypic characteristics and an estimation of influence of various cryopreservation regimes on functional potential of fetal liver cells]. The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series 'Biology' 2006; (4):110–20. Russian.
5. Goltsev AN, Dubrava TG, Ostankova LV, et al. Peculiarities of cryopreservation effect on functional potential of fetal liver hemopoietic stem cells of various gestation terms. Problems of Cryobiology. 2009;19(2): 186–99.
6. Goltsev AN, Bondarovich NA, Kuznyakov AV, et al. Determination of immunity T-cell link state and content of cancer stem cells as criterion to estimate efficiency of preventive breast cancer therapy with cryopreserved fetal liver cells. Probl Cryobiol Cryomed. 2014; 24(3):238–48.
7. Goltsev AN, Gayevskaya YuA, Dubrava TG, Ostankova LV. Effect of cryopreservation on functional status of bone marrow hemopoietic and mesenchymal stem cells in animals with autoimmune pathology. Probl Cryobiol Cryomed. 2016; 26(1): 63–72.
8. Gordienko EA, Pushkar NS. [Physical basis of low-temperature preservation of cell suspensions]. Kyiv: Naukova Dumka; 1994. 144p. Russian.
9. Grishchenko VI, Petrenko YuO, Skorobogatova NG, et al., inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of cryopreservation of hemoglobemic cells of human embryonic liver]. Patent of Ukraine № 67587A. 15.06.04. Ukrainian.
10. Grishchenko VI, Seminozhenko VP, Petrenko OYu, et al., inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of hemopoietic cells cryopreservation]. Patent of Ukraine № 58997A 15.08.03. Ukraine.
11. Grishchenko VI, Goltsev A.N. Transplantation of the products of embriofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application. Problems of Cryobiology. 2002; 12(1): 54–84.
12. Hall SR, Jiang Y, Leary E, et al. Identification and isolation of small CD44-negative mesenchymal stem/progenitor cells from human bone marrow using elutriation and polychromatic flow cytometry. Stem Cells Transl Med. 2013; 2 (8):567–78.



9. Грищенко ВІ, Семиноженко ВП, Петренко ОЮ, та ін., винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини-НАН України, патентовласник. Спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин. Патент України № 58997А, 15.08.03
10. Залкан ПМ, Ієвлева ЕА. Экспериментальная модель аллергического дерматита. В: Долгов АП, Рабен АС, Антоньев АА, редакторы. Актуальные вопросы профессиональной дерматологии. Москва: Медицина, 1965. С. 106–12.
11. Останков МВ. Влияние быстрого двухступенчатого замораживания на сохранность клеток костного мозга. Проблемы кріобіології. 2007;17 (3):283–9.
12. Ямпольская ЕЕ, Гольцев АН, Гурина ТМ. Изменение функционального потенциала клеток фетальной печени в зависимости от режима кріоконсервирования. Світ медицини та біології. 2007; (1):89–93.
13. Chinnici CM, Pietrosi G, Iannolo G, et al. Mesenchymal stromal cells isolated from human fetal liver release soluble factors with a potential role in liver tissue repair. *Differentiation*. 2019;105:14–26.
14. Félix OMWO, Tunes G, Ginani VC, et al. The influence of cell concentration at cryopreservation on neutrophil engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018;40(3):233–9.
15. Hall SR, Jiang Y, Leary E, et al. Identification and isolation of small CD44-negative mesenchymal stem/progenitor cells from human bone marrow using elutriation and polychromatic flow cytometry. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2 (8):567–78.
16. Humpe A, Beck C, Schoch R, et al. Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34⁺ cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining. *Transfusion*. 2005; 45(7): 1208–13.
17. Ikemoto J, Yoshihara S, Kobayashi T, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in cryopreserved cord blood cells for quality assessment prior to transplantation. *Mol Med Rep*. 2018;18(5): 4530–4.
18. Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, et al. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. [Internet]. 1995; 92(22): 10302–6. [Цитовано 05.09.19]. Доступно на: <https://www.pnas.org/content/pnas/92/22/10302.full.pdf>.
19. Naaldijk Y, Staude M, Fedorova V, Stolzing A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnol*. [Internet]. 2012;12:49. [Цитовано 05.09.19]. Доступно на: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-12-49>.
20. Nho SH, Yoon G, Seo JH, et al. Licochalcone H induces the apoptosis of human oral squamous cell carcinoma cells via regulation of matrix 3. *Oncol Rep*. 2019; 41(1):333–40.
21. Orlic D, Porcellini A, Rizolli V. Electron microscopy of human fetal liver erythroid cells before and after cryopreservation. *Exp Hematol*. 1982; 1(7): 628–36.
22. Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, Tamez-Gómez EL, et al. Dimethyl sulfoxide-induced toxicity in cord blood stem cell transplantation: report of three cases and review of the literature. *Acta Haematol*. [Internet]. 2009; 122(1): 1–5. [Цитовано 05.09.19]. Доступно на: <https://www.karger.com/Article/Abstract/227267>.
23. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Morphological and functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose tissue and tendons. *Cell and Organ Transplantation*. 2016; 4(2): 200–5.
24. Xu Y, Fan WW, Xu W, et al. Yiguanjian decoction enhances fetal liver stem/progenitor cell-mediated repair of liver cirrhosis through regulation of macrophage activation state. *World J Gastroenterol*. 2018; 24(42):4759–72.
25. Zhang W, Hu J, Ma Q, et al. Cryopreserved mouse fetal liver stromal cells treated with mitomycin C are able to support the growth of human embryonic stem cells. *Exp Ther Med*. 2014;8(3):935–42.
13. Humpe A, Beck C, Schoch R, et al. Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34⁺ cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining. *Transfusion*. 2005; 45(7): 1208–13.
14. Ikemoto J, Yoshihara S, Kobayashi T, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in cryopreserved cord blood cells for quality assessment prior to transplantation. *Mol Med Rep*. 2018;18(5):4530–34.
15. Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, et al. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. [Internet]. 1995; 92(22): 10302–6. [Cited 05.09.19]. Available from: <https://www.pnas.org/content/pnas/92/22/10302.full.pdf>.
16. Naaldijk Y, Staude M, Fedorova V, Stolzing A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnol*. [Internet]. 2012;12:49. [Cited 05.09.2019] Available from: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-12-49>.
17. Nho SH, Yoon G, Seo JH, et al. Licochalcone H induces the apoptosis of human oral squamous cell carcinoma cells via regulation of matrix 3. *Oncol Rep*. 2019; 41(1):333–40.
18. Orlic D, Porcellini A, Rizolli V. Electron microscopy of human fetal liver erythroid cells before and after cryopreservation. *Exp Hematol*. 1982; 1(7): 628–36.
19. Ostanikov MV. Effect of rapid two-step freezing on bone marrow cell integrity. *Problems of Cryobiology*. 2007;17 (3):283–9.
20. Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, Tamez-Gómez EL, et al. Dimethyl sulfoxide-induced toxicity in cord blood stem cell transplantation: report of three cases and review of the literature. *Acta Haematol*. [Internet]. 2009; 122(1): 1–5. [Cited 05.09.2019]. Available from: <https://www.karger.com/Article/Abstract/227267>.
21. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Morphological and functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose tissue and tendons. *Cell and Organ Transplantation*. 2016; 4(2): 200–5.
22. Xu Y, Fan WW, Xu W, et al. Yiguanjian decoction enhances fetal liver stem/progenitor cell-mediated repair of liver cirrhosis through regulation of macrophage activation state. *World J Gastroenterol*. 2018;24(42):4759–72.
23. Yampolskaya KY, Goltsev AN, Gurina TM. [Changes in the functional potential of fetal liver cells depending on the mode of cryopreservation]. *World of Medicine and Biology*. 2007; (1): 89–93. Russian.
24. Zalkan PM, Ієвлева ЕА [Experimental model of allergic dermatitis]. In: Dolgov AP, Raben AS, Antonev AA, editors. [Topical issues of professional dermatology]. Moscow: Meditsina, 1965. p 106–12.
25. Zhang W, Hu J, Ma Q, et al. Cryopreserved mouse fetal liver stromal cells treated with mitomycin C are able to support the growth of human embryonic stem cells. *Exp Ther Med*. 2014;8(3):935–42.

