

Жизнеспособность клеток эмбриональной печени человека различного фенотипа после криоконсервирования

А.И. ТАРАСОВ¹, А.Ю. ПЕТРЕНКО¹, В.И. ГРИШЕНКО¹, Д.Р.Е. ДЖОНС²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Департамент иммунологии, Королевский медицинский центр, Ноттингемский Университет, Ноттингем, Великобритания

Post-thaw Viability of Human Fetal Liver Cells of Different Phenotype

TARASOV A.I.¹, PETRENKO A.YU.¹, GRISCHENKO V.I.¹, JONES D.R.E.²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Division of Immunology, Queens Medical Centre, University of Nottingham, Nottingham, UK

Исследовали влияние стандартной процедуры криоконсервирования на жизнеспособность различных субпопуляций кроветворных клеток эмбриональной печени. Определяли жизнеспособность клеток специфического фенотипа по окрашиванию пропидиум иодидом (PI) и мечению моноклональными антителами CD34, CD45, AC133 и Gly-A. Колониеобразующую активность суспензии эмбриональной печени человека (ЭПЧ) – методом культивирования в метилцеллюлозной среде. Криоконсервирование снижает жизнеспособность стволовых кроветворных клеток (СКК) на 20-30%, эритроидно коммитированных предшественников менее чем на 10%. Колониеобразующая активность криоконсервированных стволовых клеток подтверждает адекватность измеренных значений их жизнеспособности. Полученные результаты свидетельствуют о лабильности СКК к действию низких температур и необходимости оптимизации используемых параметров их криоконсервирования.

Вивчали вплив стандартної процедури криоконсервування на життєздатність різних субпопуляцій кроветворних клітин ембріональної печінки. Життєздатність клітин специфічного фенотипу визначали по фарбуванню пропідіум іодидом та міченню моноклональними антитілами CD34, CD45, AC133 та Gly-A. Колонієутворюючу активність суспензії ембріональної печінки людини визначали методом культивування в метилцелюлозному середовищі. Криоконсервування знижує життєздатність стовбурових кроветворних клітин на 20-30%, комітованих еритроїдних попередників менше, ніж на 10%. Колонієутворююча активність криоконсервованих стовбурових клітин підтверджує адекватність вимірених значень життєздатності. Отримані результати свідчать про лабільність стовбурових кроветворних клітин до дії низьких температур і необхідність оптимізації параметрів їх криоконсервування.

The influence of standard cryopreservation procedure on the viability of different subpopulations of embryonic liver hemopoietic cells was investigated. The viability of cells of the specific phenotype was determined by propidium iodide (PI) staining and labelling with monoclonal antibodies: CD34, CD45, AC133, and Gly-A. The colony-forming activity of human embryonic liver (HEL) suspension was determined by culturing in semisolid medium. The cryopreservation decreases the viability of hemopoietic stem cells (HSC) by 20-30% while the viability of committed erythroid progenitors is decreased by less than 10%. The colony-forming activity of the cryopreserved stem cells demonstrates the validity of the viability values measured. The results obtained testify to the lability of HSC to the effect of low temperatures and appeal for the necessity of an optimisation for their cryopreservation technique.

Криоконсервирование эмбриональных стволовых клеток является одним из наиболее перспективных направлений развития современной криобиологии [2]. Это связано с широким применением эмбриональных стволовых клеток в медицинской практике. СКК ЭПЧ используются как для лечения врождённых и приобретённых заболеваний различной этиологии [12], так и для экспансии гемопоэтической ткани в условиях *ex vivo* [9].

Криоконсервирование СКК ЭПЧ производится по стандартным протоколам замораживания под защитой ДМСО. Используется либо медленное (1°C/мин) охлаждение до -80°C с последующим погружением в жидкий азот [6], или двухэтапный режим [4], включающий медленное охлаждение до -40°C (с инициацией при -3°C и эквilibрацией при -25°C) и быстрое охлаждение от -40 до -80°C с

Cryopreservation of embryonic stem cells is one of the most perspective directions in development of modern cryobiology [2]. This is due to a wide number of applications of embryonic stem cells in clinical practice. HSC from HEL are used both for the treatment of congenital and acquired diseases of various etiology [12] and for *ex vivo* expansion of hematopoietic tissue [9].

Cryopreservation of HSC from HEL is performed using the standard protocols under Me₂SO protection. The following techniques are used: slow cooling (1°C/min) down to -80°C with subsequent plunging into liquid nitrogen [6], and two-stage regimen [4], including slow cooling down to -40°C (with initiation at -3°C and equilibration at -25°C) and rapid cooling from -40°C down to -80°C with following plunging into liquid nitrogen. These methods are considered to be the

последующим погружением в жидкий азот. Считается, что данные протоколы оптимальны для консервирования гемопоэтических мононуклеаров как с точки зрения сохранности клеток, так и их простоты.

Сохранность клетки при криоконсервировании зависит от её способности избежать воздействия двух основных факторов низкотемпературного повреждения – экспозиции в гиперконцентрированных растворах солей (так называемого “эффекта раствора”) и внутриклеточной кристаллизации и роста кристаллов льда [8]. Эта способность обусловлена как устойчивостью к “эффекту раствора”, так и высоким значением проницаемости плазматической мембраны для воды, что позволяет клетке быстро дегидратироваться, препятствуя внутриклеточному кристаллообразованию. Цель данной работы – определить устойчивость гемопоэтических клеток ЭПЧ разной степени коммитированности к стандартной процедуре криоконсервирования.

Суспензию клеток получали из печени плодов человека 6 – 12 недель гестации, замораживали под защитой 5%-го ДМСО по двухэтапному режиму [4], отогревали на водяной бане при 37°C, после чего клетки отмывали от криопротектора. Жизнеспособность до и после криоконсервирования определяли по окрашиванию трипановым синим. Подсчёт клеток производили в камере Горяева под оптическим микроскопом.

Клетки ЭПЧ малой плотности выделяли на 1,071 градиенте Percoll (Pharmacia). Выделенные клетки, так же как и первичную (тотальную) суспензию клеток ЭПЧ, окрашивали моноклональными антителами, мечеными флуоресцентными красителями: CD34-PE/FITC, CD45-FITC, AC133-PE и Glycophorin-A-FITC. Содержание клеток специфического иммунофенотипа определяли методом проточной цитометрии на клеточном сортере EPICS Altra (Beckman Coulter). Жизнеспособность клеток специфического иммунофенотипа определяли одновременно с их содержанием с помощью дополнительного окрашивания PI.

Культивирование клеток выполняли в чашках Петри диаметром 35 мм в полутвёрдой среде в атмосфере с 5% CO₂ в воздухе и 100%-й влажностью при 37°C. В состав среды входили: 1.3% метилцеллюлозы, 4.0 мМ глутамин, 10 ед/мл пенициллин-стрептомицин, 100 ед/мл GM-CSF, 100 ед/мл IL-3, 50 нг/мл SCF и 10 ед/мл эритропоэтина. Готовую среду пропускали через 0.22 мкм фильтр и к 770 мкл среды добавляли 10⁵ клеток (тотальная суспензия) в 230 мкл RPMI-1640. Подсчёт количества и типа колоний (БОЕ-Э, КОЕ-ГМ и КОЕ-ГЭММ) проводили на 14-е сутки культивирования.

Статистический анализ данных выполняли при помощи пакета SPSS-9.0. Для оценки достоверности результатов использовали критерий Вилкоксона, парные коэффициенты корреляции определяли по r -методу Спирмена. Достоверными считались различия с уровнем значимости $p < 0,05$.

optimal ones for the hematopoietic mononuclear cell preservation both from the aspect of cells integrity and the simplicity of the procedure.

Cell integrity during cryopreservation depends on its ability to avoid the influence of two major low temperature damage factors which are the exposure to highly concentrated solutes (so-called “solution effect”) and intracellular crystallisation with growth of ice crystals [8]. This capability is stipulated both by resistance to “solution effect” and high value of plasmatic membrane permeability for water, that allows the rapid cell dehydration, avoiding the intracellular crystal formation. The aim of this work is to determine the resistance of differently committed HEL hematopoietic cells to a standard cryopreservation procedure.

Cell suspension was obtained from liver of human embryos of 6-12 gestation' weeks frozen under 5% Me₂SO protection according to two-stage regimen [4], thawed on water bath at 37°C and then washed-out of cryoprotectant. The viability before and after cryopreservation was assessed by trypan blue staining. Cell counting was performed in laboratory hemocytometer using optical microscope.

Low density HEL cells were separated using 1.071 Percoll gradient (Pharmacia). Separated cells, as the total HEL cell suspension, were stained with monoclonal antibodies, labelled with fluorescent dyes: CD34-PE-FITC, CD45-FITC, AC133-PE and Glycophorin-A-FITC. The content of cells of specific immunophenotype was determined using flow cytometry on EPICS Altra cell sorter (Beckman Coulter). Viability of cells of specific immunophenotype was determined simultaneously using propidium iodide staining.

Cell culturing was performed in 35 mm Petri dishes in semisolid medium in atmosphere with 5% CO₂ and 100% humidity at 37°C. The medium comprised of 1.3% methylcellulose, 4.0 mM glutamine, 10 U/ml of penicillin-streptomycin, 100 U/ml of GM-CSF, 100 U/ml of IL-3, 50 ng/ml of SCF and 10 U/ml of erythropoietin in IMDM. Final medium was filtered through 0.22 mcm filter and then 10⁵ cells (total suspension) in 230 mcm of RPMI-1640 were added to 770 mcl of medium. Colony count (BFU-E, CFU-GM and CFU-GEMM) was performed on 14th day of culturing.

Statistical analysis of data was performed using SPSS-9.0 software package. Statistical significance was estimated by Wilcoxon criterion, coupled coefficients of correlation were determined by Spearman ρ -method. The differences were considered as statistically significant if significance value p was less than 0.05. Data are presented as “mean \pm standard error of mean”.

Total viability according to Trypan blue staining after cryopreservation and washing-out was determined as 71 \pm 4%.

Content of cells of specific immunophenotype was determined by method of HEL cells flow cytometry. The results are shown in Fig.1 as dot plots. Each dot in the plot corresponds to a cell, dot's coordinates

Данные представлены в виде “среднее±стандартная ошибка среднего”.

После криоконсервирования и отмывки криопротектора общая жизнеспособность по окрашиванию трипановым синим составляла до 71±4%.

Содержание клеток специфического иммунофенотипа было определено методом проточной цитометрии клеток ЭПЧ. Ее результаты представлены на рис.1 в виде точечных графиков. Каждая точка на графике соответствует клетке, координаты точки - различным параметрам этой клетки. В данном случае параметрами являются интенсивности свечения клеток, меченых флуоресцентными моноклональными антителами, что соответствует степени экспрессии на мембране того или иного антигена. Экспрессирующими антиген считали клетки, интенсивность флуоресценции которых превосходила интенсивность флуоресценции неспецифического контроля. Обозначения PE и FITC (рис. 1) соответствуют фикоэритрину и флуоресцеин-изотиоцианату, флуоресцентным маркерам, конъюгированным с моноклональными антителами. Нами определялось содержание клеток, экспрессирующих CD34 (используется как общий маркер прогениторных гемопоэтических клеток), AC133 (маркер гемопоэтических клеток-предшественников), CD45 (экспрессируется на всех зрелых лейкоцитах и лимфоидно коммитированных клетках, так же как и на гемопоэтических клетках-предшественниках) и гликофорин А (экспрессируется коммитированными эритроидными предшественниками разной степени зрелости, а также эритроцитами).

Как видно, содержание CD34⁺ клеток в тотальной суспензии ЭПЧ составляло 0,89±0,09%, а CD45⁺ клеток - 2,33±0,25%. Содержание CD34⁺CD45⁺ клеток составляло 0,82±0,09%, а содержание GlyA⁺ клеток – 90,00±2,54%, AC133⁺ клеток – 0,39±0,07%, при этом подавляющее большинство (0,28±0,07%) AC133⁺ клеток экспрессировало ещё и CD34 антиген.

Центрифугирование в градиенте плотности позволяло повысить содержание CD34⁺, CD45⁺ и AC133⁺ клеток в несколько раз. Как видно из таблицы, достаточно простое одноступенчатое разделение клеток в градиенте плотности обогащает содержание прогениторных клеток в суспензии ЭПЧ в 2,5 – 4,25 раза. Жизнеспособность клеток специфического иммунофенотипа также определялась методом проточной цитометрии с помощью дополнительного окрашивания PI. Общая жизнеспособность суспензии криоконсервированных ядросодержащих клеток составляла 93,91±0,82%. Полученные данные (рис.2) свидетельствуют о максимальной жизнеспособности фракции GlyA⁺ клеток (жизнеспособность 93,75±1,60%). Более ранние CD34⁺ (жизнеспособность 79,57±4,13%), AC133⁺ (жизнеспособность 77,16±4,81%), а также CD45⁺ (жизнеспособность 84,93±4,93%) клетки оказались менее жизнеспособными и, следо-

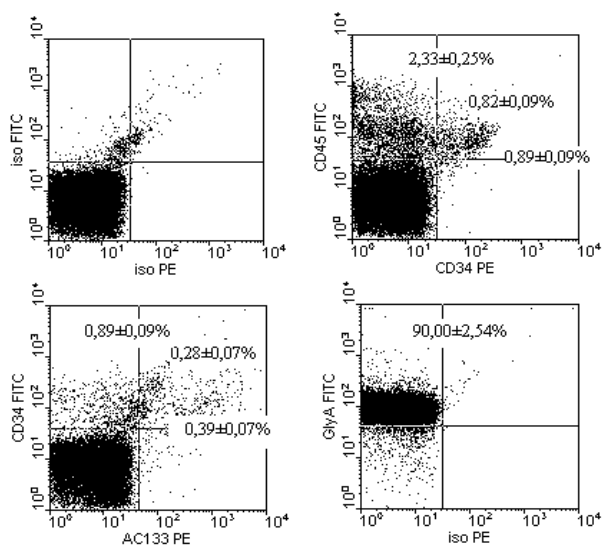


Рис.1. Фенотипический анализ клеток ЭПЧ.

Fig. 1. Phenotypic analysis of HEL cells.

correspond to various parameters of this cell. In this case, the parameters are the fluorescence intensity of cells, labelled with monoclonal antibodies, that corresponds to the expression rate of one or another antigen on the membrane. The cells were considered as antigen expressing if their fluorescence intensity was higher than that of the nonspecific control. PE and FITC designations (Fig. 1) correspond to phycoerythrin and fluorescein-isothiocyanate, fluorescent markers, conjugated with monoclonal antibodies. We have determined the content of cells, expressing CD34 (used as a general marker of progenitor hematopoietic cells), AC133 (marker of hematopoietic progenitor cells), CD45 (is expressed on all mature leucocytes and lymphoid committed cells, as well as on hemopoietic progenitor cells) and glycoforine A (is expressed by committed erythroid progenitors of various maturation stage and by erythrocytes). As it is seen the CD34⁺ cell content in total HEL suspension made 0.89±0.09%, CD45⁺ cell content made 2.33±0.25%. CD34⁺CD45⁺ cell content made 0.82±0.09%. Content of Gly-A⁺ cells was 90.00±2.54%, CD133⁺ made 0.39±0.07%, the majority of CD133⁺ cells (0.28±0.07%) also expressing CD34 antigen.

Centrifugation in density gradient allowed to increase the content of CD34⁺, CD45⁺ and AC133⁺ cells in several times. As it is seen from Table 1 a simple cell separation in density gradient enriches the content of progenitor cells in HEL suspension in 2.5-4.25 times.

The viability of cells of specific immunophenotype was also determined by flow cytometry using an additional PI staining. The total viability of the cryopreserved nucleated cell suspension made 93.91±0.82%. The obtained data testify to the maximal viability of GlyA⁺ cells (the viability of 93.75±1.60%). The earliest CD34⁺ (viability of 77.16±4.81%), and

Обогащение суспензии клеток ЭПЧ в градиенте плотности.
Enrichment of HEL suspension cells in density gradient

Φάση Phenotype	CD 34 ⁺	AC 133 ⁺	CD 34 ⁺ AC 133 ⁺	CD 45 ⁺	GlyA ⁺
Πριν διαχωρισμό, % Before separation, %	0,89± 0,09	0,39± 0,07	0,28± 0,07	2,33± 0,25	90,00± 2,54
Μετά διαχωρισμό, % After separation, %	3,78± 0,48	1,09± 0,07	0,7± 0,10	8,99± 0,42	80,54± 0,74
Ποσοστό εμπλουτισμού, xN Enrichment, xN	4,25± 0,97	2,79± 0,68	2,50± 0,98	3,86± 0,59	0,89± 0,03

вательно, более чувствительными к консервированию.

Колониеобразующую активность клеток ЭПЧ определяли методом культивирования в полутвёрдой среде. На 14-е сутки культивирования образовывалось 187,75±21,21 БОЕ-Э, 172,43±31,91 КОЕ-ГМ, 153,64±33,58 КОЕ-ГЭММ, что свидетельствует о сохранении функциональной активности колониеобразующих клеток. Проведённый корреляционный анализ позволил выявить достоверные корреляции между жизнеспособностью CD34⁺ клеток и числом КОЕ-ГЭММ и БОЕ-Э, а также жизнеспособностью и содержанием AC133⁺ клеток и числом КОЕ-ГМ и БОЕ-Э.

Основная задача данной работы состояла в определении устойчивости клеток специфического иммунофенотипа к процедуре криоконсервирования, следовательно, нас интересовала сохранность клеток после отогрева. При этом сохранность клетки отождествлялась с её жизнеспособностью. Окрашивание трипановым синим и PI позволяет, как известно [11], отмечать лишь целостность плазматической мембраны, а не сохранность функциональной активности клетки. Кроме того, при одновременном окрашивании PI, FITC и PE могут возникнуть артефакты: PI⁺ клетке может быть ошибочно приписано FITC или PE свечение.

Корректность метода определения сохранности была проверена при оценке колониеобразующей активности клеток ЭПЧ. Положительная корреляция между жизнеспособностью CD34⁺ клеток по окрашиванию PI и числом образуемых колоний позволила рассматривать окрашивание PI как корректный в рамках данной работы метод определения сохранности клеток.

При анализе результатов проточной цитометрии (рис. 1), мы не рассматривали клетки с аномально высоким FITC и PE свечением, поэтому популяции располагались на точечных графиках достаточно локально. Кроме того, нежизнеспособные клетки располагались также в достаточно локальном регионе точечного графика SSC/FSC. Такое ограничение могло привести к некоторому завышению значений жизнеспособности и занижению числа клеток специфического фенотипа. Однако оно позволило считать использованный метод определения жизнеспособности клеток корректным.

Различия в жизнеспособности тотальной суспензии ЭПЧ по окрашиванию трипановым синим

CD45⁺ cells (viability of 84.93±4.93%) occurred to be less viable, and therefore more sensible to cryopreservation.

Colony forming ability of HEL cells was determined by culturing in semisolid medium. To the 14th day of culturing there was 187.75±21.21 of BFU-E, 172.43±31.91 of CFU-GM, 153.64±33.58 of CFU-GEMM, that testifies to the preserving of the functional activity of colony forming

cells. The correlation analysis allowed to reveal a statistically significant correlation between CD34⁺ cells viability and CFU-GEMM and BFU-E number, and the viability and content of CD133⁺ cells and the number of CFU-GM and BFU-E. The main aim of this work was to determine the resistance of cells of specific immunophenotype to the cryopreservation procedure, therefore, we were interested in cell integrity after thawing. Here, we have equalized the cell integrity as its viability. Trypan blue and PI staining allows, as it is known [11], only to detect if the plasmatic membrane is intact but not the functional activity. Furthermore, due to simultaneous staining with PI, FITC and PE there could arise the artifacts, when the PI⁺ cell could be misconsidered as the one with FITC or PE fluorescence.

The validity of the determination of the integrity was confirmed by estimating the colony forming activity of HEL cells. Positive correlation between CD34⁺ cells viability by PI staining and the number of the formed colonies allowed the consideration of PI staining as the proper method for cell integrity determination within the frames of this work.

When analysing the results of flow cytometry we did not take into account the cells with abnormally high

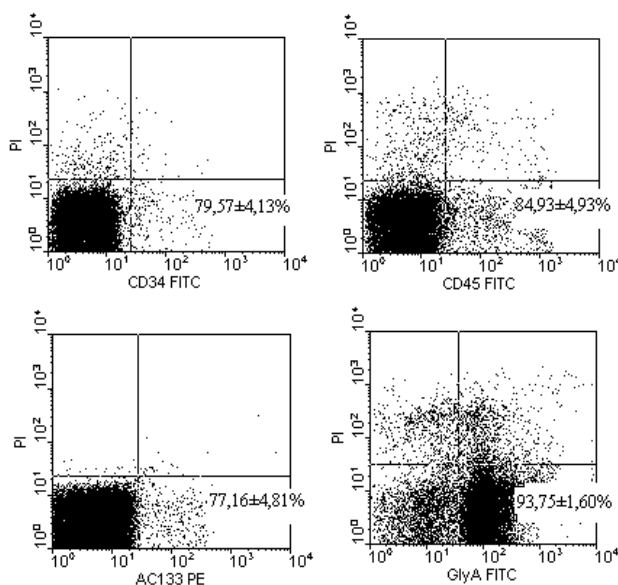


Рис. 2. Жизнеспособность клеток ЭПЧ специфического иммунофенотипа.

Fig. 2. Viability of HEL cells of specific immunophenotype.

(71±4%) и PI (93,91±0,82%), с нашей точки зрения, обусловлены как уже упомянутым некоторым завышением жизнеспособности при оценке результатов проточной цитометрии, так и различной проницаемостью плазматической мембраны для двух использованных красителей.

Существует мнение [1] о повышенной устойчивости стволовых гемопоэтических клеток к внешним воздействиям. Оно основано на особенностях их клеточного цикла. В цикле СКК присутствует фаза покоя (G_0 -фаза), в течение которой клетки подвергаются “естественному консервированию”: метаболизм замедляется, не происходит синтеза ДНК и т.п. [10]. Морфологические наблюдения подтверждают увеличение поверхностно-объемного отношения клеток и уменьшение осмотически активного объема, что снижает время дегидратации при замораживании. Экспериментально доказанная радио- и химиоустойчивость [5,7] СКК объясняется изменениями, характерными для G_0 -фазы. Следовало ожидать, что среди клеток суспензии ЭПЧ именно СКК окажутся более жизнеспособными и менее прихотливыми в отношении режимов замораживания.

Согласно полученным результатам, в ЭПЧ как в основном органе кроветворения [3] преобладают гемопоэтические клетки, среди которых СКК составляют лишь малую долю. Более 90% клеток суспензии ЭПЧ экспрессирует GlyA, что свидетельствует об эритроидной коммитации. Таким образом, общая жизнеспособность суспензии ЭПЧ подтверждает жизнеспособность эритроидных предшественников различной степени зрелости и может не отражать сохранность СКК.

Можно полагать, что и среди эритроидных клеток доминирует какая-то одна субпопуляция с характерными криобиологическими параметрами, причём они позволяют клеткам избежать действия повреждающих факторов низкотемпературного консервирования при использовании данного режима замораживания. По сравнению с эритроидными клетками СКК повреждаются больше, следовательно, криобиологические параметры СКК отличаются от параметров эритроидных клеток. Очевидно оптимальные скорости замораживания СКК и эритроидных предшественников будут различными. Возможно, при используемом протоколе замораживания СКК не успевают полностью дегидратироваться до достижения температуры внутриклеточной кристаллизации, и образующиеся в результате внутриклеточные кристаллы льда перфорируют плазматическую мембрану СКК. Но СКК может обезвживаться достаточно быстро (эта точка зрения согласуется с уже описанными наблюдениями особенностей клеточного цикла СКК) и подвергаться более длительной экспозиции в гиперконцентрированном растворе, что и обуславливает меньшую жизнеспособность. Различия в кинетике транспорта ДМСО через плазматическую мембрану могут быть рассмотрены как ещё одна возможная причина разной устойчивости клеток ЭПЧ к дей-

FITC and PE fluorescence, that is why the considered populations had quite narrow localisation on the dot plots. Furthermore, non-viable cells were localised also in quite a narrow region of SSC/FSC dot plot. This limitation could lead to some overestimating of the viability values and decreasing of the number of cells of specific phenotype. However it allowed to consider the utilized method of cell viability determination as a proper one.

Differences in the viability of total HEL suspension estimated by staining with Trypan blue (71±4%) and PI (93.91±0,82%) are preconditioned, from our point of view, by both already mentioned overestimation of viability during evaluation of flow cytometry results, and different plasmatic membrane permeability for each of two dyes used.

There exists an opinion [1] about an increased resistance of hematopoietic stem cells to the external stresses emanating from the peculiarities of their cell cycle. In HSC cycle there is a quiescence phase (G_0 -stage), during which the cells become “naturally preserved”: the metabolism is slowing down, no DNA synthesis occurs, etc [10]. Morphological observations confirm the increasing of the surface-volume ratio of cells and decreasing of osmotically active volume, that reduces the dehydration time during freezing. Experimentally proved radio- and chemoresistance of HSC [5, 7] is explained by the changes, being characteristic to G_0 stage. It should be expected, that among the HEL cell suspension the HSC will appear to be more viable and less sensible to freezing stages.

According to the obtained results, HEL, as a major blood forming organ [3], contains mainly hemopoietic cells, among which the HSC make only small part. More than 90% of HEL suspension cells express GlyA, that testifies to the erythroid commitment. Thus, total viability of HEL suspension confirms the integrity of erythroid progenitors of various maturation stage and may not show the HSC integrity.

It could be supposed that among the erythroid cells dominates a distinct subpopulation with characteristic cryobiological parameters, and they allow the cells to avoid the action of low temperature preservation damage factors when using this freezing regimen. Compared to erythroid cells, the HSC become damaged in greater extent, thus, cryobiological parameters of HSC differ from those of erythroid cells. It is evident that optimal freezing rates of HSC and erythroid progenitors will be different. It is possible, that by the freezing protocol utilized, the HSC have not fully dehydrated to the moment of intracellular crystallisation, and intracellular ice crystals perforate the HSC plasmatic membrane. However, HSC can dehydrate quite rapidly (this opinion agrees with described observation of HSC cell cycle features) and undergo longer exposure in hyperconcentrated solution, that leads to the decreased viability. Differences in Me_2SO transport via plasmatic membrane could be considered as another reason of various resistance of HEL cells to the effect of low temperature preservation damaging factors. However, our investigation does not

вию повреждающих факторов низкотемпературного консервирования. Однако наше исследование не позволяет однозначно указать, как конкретно должен быть оптимизирован используемый протокол замораживания. Для оптимизации необходимо исследовать кинетику транспорта воды и ДМСО через плазматическую мембрану СКК.

Работа выполнена при поддержке INTAS (Тарасов А.И., YSF00-188) и Wellcome Trust (Петренко А.Ю.).

Литература

1. *Гаврилов О.К., Козинец Г.И., Черняк Н.Б.* Клетки костного мозга и крови.– М.: Медицина, 1985.– 288 с.
2. *Грищенко В.И.* Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 7–8.
3. *Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Шерешков С.И.* Гемопоэтические клетки эмбриональной печени.– Киев: Наук. думка, 1988.– 192 с.
4. *Грищенко В.И., Тарасов А.И., Руденко С.В., Петренко А.Ю.* Чувствительность к программному и циклическому замораживанию-отогреву клеток эмбриональной печени человека 7-12 недель гестации // Пробл. криобиологии.– 2000.– №4.– С. 37–44.
5. *Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я.* Клеточные основы кроветворения.– М.: Медицина, 1977.– 272 с.
6. *Leibo S.P., Mazur P.* The role of cooling rates in low temperature preservation // *Cryobiology*.– 1971, – 8.– P. 447
7. *Lerner C., Harrison D.E.* 5-fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation // *Exp. Hematol.* – 1990. – 18. – P. 114.
8. *Mazur P.* Kinetics of Water Loss from Cells at subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing // *J. Gen. Physiol.*– 1963.– V. 47, N 2.– P. 347–369.
9. *Mellado-Damas N., Rodriguez J.M., Carmona M. et al.* Ex-vivo expansion and maturation of CD34-positive hematopoietic progenitors optimization of culture conditions // *Leukemia Research*.– 1999.– 23.– P. 1035–1040.
10. *Ogawa M.* Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells // *Blood*. – 1993.– V. 81, N11.– P. 2844–2853.
11. *Shier W.T.* The final steps to toxic cell death // *The Journal of Toxicology*. – 1985.– 4(2).– P. 191–249.
12. *Touraine J.-L., Raudrant D., Laplace S.* Transplantation of Hemopoietic Cells From the Fetal Liver to Treat Patients With Congenital Diseases Postnatally or Prenatally // *Transplantation Proceedings*.– 1997.– 29.– P. 712–713.

Поступила 2.07.2002

allow to answer, how the freezing protocol utilized could be optimized in fact. For this reason it is necessary to investigate the kinetics of water and Me₂SO transport via HSC plasmatic membrane.

This work was supported by INTAS (Tarasov A.I., YSF00-188) and Wellcome Trust (Petrenko A.Yu.).

References

1. *Gavrilov O.K., Kozinets G.I., Chernyak N.B.* Cells of bone marrow and blood.– M.: Meditsina, 1985.– 288 p.
2. *Grischenko V.I.* Role of cryobiology in creating the cell and tissue transplantation biotechnologies // *Probl. of Cryobiology*.– 2001.– N3.– P.7–8.
3. *Grischenko V.I., Lobyntseva G.S., Votyakova I.A., Shereshkov S.I.* Hemopoietic cells of embryonic liver.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 192 p.
4. *Grischenko V.I., Tarasov A.I., Rudenko S.V., Petrenko A.Yu.* Sensitivity to a programmed and cycled freeze-thawing of human embryonic liver cells of 7-12 weeks of gestation // *Probl. of Cryobiology*.– 2000.– N4.– P. 37–44.
5. *Chertkov I.L., Fridenstein A.Ya.* Cellular bases of hemopoiesis. M.: Meditsina, 1977.– 272 p.
6. *Leibo S.P., Mazur P.* The role of cooling rates in low temperature preservation // *Cryobiology*.– 1971, – 8.– P. 447
7. *Lerner C., Harrison D.E.* 5-fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation // *Exp. Hematol.* – 1990. – 18. – P. 114.
8. *Mazur P.* Kinetics of Water Loss from Cells at subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing // *J. Gen. Physiol.*– 1963.– V. 47, N 2.– P. 347–369.
9. *Mellado-Damas N., Rodriguez J.M., Carmona M. et al.* Ex-vivo expansion and maturation of CD34-positive hematopoietic progenitors optimization of culture conditions // *Leukemia Research*.– 1999.– 23.– P. 1035–1040.
10. *Ogawa M.* Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells // *Blood*. – 1993.– V. 81, N11.– P. 2844–2853.
11. *Shier W.T.* The final steps to toxic cell death // *The Journal of Toxicology*. – 1985.– 4(2).– P. 191–249.
12. *Touraine J.-L., Raudrant D., Laplace S.* Transplantation of Hemopoietic Cells From the Fetal Liver to Treat Patients With Congenital Diseases Postnatally or Prenatally // *Transplantation Proceedings*.– 1997.– 29.– P. 712–713.

Accepted in 2.07.2002