

# Влияние различных режимов криоконсервирования на сохранность стволовых кроветворных клеток костного мозга животных с аутоиммунными заболеваниями

## Часть 1. Оценка *in vitro* функционального статуса кроветворных предшественников криоконсервированного костного мозга

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Т.Г. ДУБРАВА, Ю.А. КОЗЛОВА, М.В. ОСТАНКОВ, Т.М. ГУРИНА  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

# Effect of Different Cryopreservation Regimens on Integrity of Bone Marrow Stem Hemopoietic Cells in Animals with Autoimmune Diseases

## Part 1. *In vitro* Estimation of Functional Status of Cryopreserved Bone Marrow Hemopoietic Precursors

A.N. GOLTSEV, T.G. DUBRAVA, YU.A. KOZLOVA, M.V. OSTANKOV, T.M. GURINA  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

В системе *in vitro* определены функциональные характеристики стволовых кроветворных клеток (СКК) костного мозга (КМ) здоровых животных и с аутоиммунными заболеваниями (АИЗ) до и после криоконсервирования с использованием различных режимов. Показаны принципиальные различия изменения функционального статуса кроветворных предшественников здоровых доноров и с АИЗ при аналогичных условиях криоконсервирования. Отмечено, что варьирование концентрацией криопротектора при одной и той же скорости замораживания позволяет выделить оптимум условий, при которых факторы криоконсервирования в равной степени влияют не только на функциональный статус кроветворных клеток разной степени дифференцировки, но и полученного от разных доноров (физиология и патология) КМ. В то же время разные скорости замораживания имеют идентичные параметры селективного влияния на СКК определенного уровня дифференцировки в здоровом и "патологическом" КМ. Установлено, что оптимальными в отношении обеспечения функционального потенциала этих клеток в КМ оказались различные условия криоконсервирования. Так, максимальное количество и наиболее сбалансированный субпопуляционный состав кроветворных предшественников в виде колониеобразующих единиц грануломоноцитопоза (КОЕ-ГМ) и формирующих колонии в селезенке летально облученных реципиентов (КОЕс) КМ здоровых животных был сохранен после замораживания со скоростью 1°C/мин с 10%-м диметилсульфоксидом (ДМСО), а для КМ животных с АИЗ – 40°C/мин с 10%-м ДМСО. Очередной раз на конкретном примере подчеркивается правомочность ранее высказанной авторами идеи о возможности использования криоконсервирования как фактора направленной регуляции состояния биообъекта и, в частности, кроветворных предшественников КМ с различным исходным статусом.

**Ключевые слова:** костный мозг, кроветворные предшественники (КОЕ-ГМ, КОЕс), аутоиммунные заболевания, адьювантный артрит, методы криоконсервирования

У системі *in vitro* визначено функціональні характеристики стовбурових кроветворних клітин (СКК) кісткового мозку (КМ) здорових тварин і з аутоімунними захворюваннями (АІЗ) до і після криоконсервування з використанням різних режимів. Показано принципові відмінності зміни функціонального статусу кроветворних попередників здорових донорів і з АІЗ при аналогічних умовах криоконсервування. Зазначено, що варіювання концентрацією криопротектора при одній і тій же швидкості заморожування дозволяє виділити оптимум умов, при яких чинники криоконсервування в рівній мірі впливають не тільки на функціональний статус кроветворних клітин різної міри диференціювання, але й отриманого від різних донорів (фізіологія і патологія) КМ. У той же час різні швидкості заморожування мають ідентичні параметри селективного впливу на СКК певного рівня диференціювання в здоровому і "патологічному" КМ. Встановлено, що оптимальними відносно забезпечення функціонального потенціалу цих клітин в КМ виявилися різні умови криоконсервування. Так, максимальна кількість і найбільш збалансований субпопуляційний склад кроветворних попередників у вигляді колонієутворюючих одиниць грануломоноцитопоза (КУО-ГМ) і формуючих колонії в селезінці летально опромінених реципієнтів (КУОс) КМ здорових тварин був збережений після заморожування зі швидкістю 1°C/хв з 10%-м ДМСО, а для КМ тварин з АІЗ – 40°C/хв з 10%-м ДМСО. На конкретному прикладі підкреслюється правомочність раніше висловленої авторами ідеї про можливість використання криоконсервування як чинника направленої регуляції стану кроветворних попередників КМ з різним початковим статусом.

**Ключові слова:** кістковий мозок, кроветворні попередники (КУО-ГМ, КУОс), аутоімунні захворювання, адьювантний артрит, методи криоконсервування.

Functional characteristics of hemopoietic stem cells (HSCs) of bone marrow (BM) in healthy animals and those with autoimmune diseases (AIDs) before and after cryopreservation using different regimens were *in vitro* determined. Fundamental differences of a change in functional status of hemopoietic precursors in healthy and AIDs donors under the same changes in cryopreservation

**Адрес для корреспонденции:** Гольцев А.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-10, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Goltsev A.N., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3010, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

conditions are shown. It was noted, that varying concentrations of cryoprotectant at the same freezing rate enabled to point out the optimum of conditions, under which the cryopreservation factors equally affected both functional status of hemopoietic cells of different differentiation rate and BM, procured from different donors (physiology and pathology). At the same time different freezing rates have identical parameters of a selective effect on SHCs with a certain differentiation level in healthy and "pathological" BM. Different cryopreservation conditions were established to be the optimal ones in respect to providing functional potential of these cells in both BMs. Thus, the maximum number and the most balanced subpopulation composition of hemopoietic precursors as colony-forming units of granulomonocytopoiesis (CFU-GM) and forming colonies in spleen of lethally irradiated recipients (CFUs) of healthy animals' BM were preserved after freezing with 1°C/min rate and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 40°C/min with 10% DMSO for BM of AIDS animals. The relevance of idea, recently given by authors about the possibility to use cryopreservation as a factor of directed regulation of bioobject's state and, in particular, BM hemopoietic precursors with different initial status is emphasized with a specific example.

**Key-words:** bone marrow, hemopoietic precursors (CFU-GM, CFUs), autoimmune diseases, adjuvant arthritis, cryopreservation methods.

Оптимизация методов криоконсервирования КМ с различным исходным морфофункциональным состоянием стала еще более актуальной проблемой в связи с востребованностью аутологичного КМ для лечения ряда АИЗ и соответственно необходимостью его хранения при субнулевых температурах [5, 7, 15, 16]. Очевидно, что эффективность аутотрансплантации криоконсервированного КМ будет определяться степенью сохранности различных его клеточных популяций, в первую очередь СКК, а также стромальных элементов кроветворного микроокружения, обладающих "трансплантабельностью" и выполняющих в отношении этих клеток аксессуарные функции [3, 4, 13]. Морфофункциональные характеристики клеточно-тканевых субстратов гемопоетической системы при АИЗ отличаются от таковых при физиологических условиях [2, 10, 12]. Устойчивость биологического материала к действию факторов низкотемпературного консервирования определяется его исходным структурно-функциональным состоянием [3, 8, 11]. Поэтому необходимо в теоретическом и прикладном аспектах изучать особенности изменения функционального статуса СКК костного мозга пациентов с АИЗ после действия физико-химических факторов, реализуемых в процессе криоконсервирования, для отработки оптимальных режимов криоконсервирования такого КМ.

Цель работы – изучить в сравнительном аспекте особенности влияния различных режимов криоконсервирования на колониеобразующую активность разной степени дифференцировки СКК костного мозга животных с адьювантным артритом (АА) в системе *in vitro*.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на мышках-самцах линии СВА/СaЛас 4-месячного возраста массой 20-25 г. Все манипуляции с животными выполнены согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г). Адьювантный артрит индуци-

Optimizing methods for BM cryopreservation with a different initial morphofunctional state occurred to be more actual task due to a need in autologous BM for treating some AIDS and, correspondingly, to a necessity for its storage under subzero temperatures [5-7, 15, 17]. The efficiency of cryopreserved BM autotransplantation will be evidently determined by the integrity degree of its different cellular populations, primarily HSCs, as well as stromal elements of hemopoietic microenvironment, possessing a "transplantability" and realizing accessory functions regarding these cells [3, 4, 13]. Morphofunctional characteristics of hemopoietic system cell-tissue substrates at AIDS differ from those under physiological conditions [2, 10, 12]. Resistance of biological material to the effect of factors of low temperature preservation is determined by its initial structural and functional state [8, 11]. Therefore the peculiarities of a change in BM HSCs functional status in AIDS patients after the effect of physical and chemical factors, realized during cryopreservation are needed to be investigated in both theoretical and applied aspects in order to work-out the optimal regimens for such BM cryopreservation.

The work was aimed to a comparative study of peculiarities of different cryopreservation regimens influence on a colony-forming activity of bone marrow SHCs of different differentiation degree in animals with adjuvant arthritis (AA) *in vitro*.

### Materials and methods

Experiments were carried-out in 4 months' CBA/CaLac male mice with 20-25 g weight. All manipulations with animals were performed according to the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985). Adjuvant arthritis was induced by subplantar introduction of a complete Freund's adjuvant [14]. Investigation object was animal's BM, procured to the 14<sup>th</sup> day of AA development, which was washed-out from femoral bones with 199 medium with adding 100% embryonic calf serum and 20% sodium citrate. Healthy animal's

ровали субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда [14]. Объектом исследования был КМ животных, полученный на 14-е сутки развития АА, который вымывали из бедренных костей средой 199 с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки и 2%-го цитрата натрия. Контролем служил КМ здоровых животных. Суспензию клеток криоконсервировали в той же среде под защитой 5, 7 и 10%-го ДМСО (в конечной концентрации) в полиэтиленовых криоконтейнерах фирмы Nunc объемом 1 мл с концентрацией  $6,0 \times 10^6$  клеток/мл на программном замораживателе "Cryoson" (Германия). В работе были апробированы программы криоконсервирования со следующими скоростями охлаждения:

- 1°C/мин до –40°C с последующим погружением в жидкий азот (режим 1);
- 10°C/мин, 10-минутная выдержка при температуре –40°C с последующим погружением в жидкий азот (режим 2);
- 40°C/мин, 10-минутная выдержка при температуре –40°C с последующим погружением в жидкий азот (режим 3).

Суспензию отогревали на водяной бане при температуре 38-40°C в течение 40-50 с. После криоконсервирования клетки КМ отмывали от криопротектора медленным добавлением равного объема рабочей среды и последующим центрифугированием.

Для оценки содержания кроветворных предшественников КОЕ-ГМ использовали метод культивирования суспензии КМ с концентрацией  $1 \times 10^5$  клеток/мл в полужидком агаре при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха [9]. Учет КОЕ-ГМ нативного КМ контрольных животных и с АА проводили на 7-е сутки культивирования. При исследовании динамики формирования структур нативным КМ этих групп животных не было отмечено достоверных отличий их количества с 7-х по 14-е сутки. Содержание кроветворных клеток-предшественников в криоконсервированном КМ определяли на 14-е сутки культивирования, учитывая тот факт, что пролиферативная активность КОЕ-ГМ после криоконсервирования временно ингибирована [7]. Интегральный показатель КОЕ-ГМ – это сумма предшественников, формирующих структуры до 20 клеток (кластеры) и более 20 клеток (колонии). Для оценки распределения в КМ кроветворных клеток с различной степенью дифференцировки (менее дифференцированные предшественники формируют колонии, более – кластеры [1]) был введен индекс пролиферативной активности (ИПА КОЕ-ГМ), представляющий собой отношение колониеобразующих предшественников к кластеробразующим.

BM served as the control. Cell suspension was cryopreserved in the same medium under 5, 7 and 10% DMSO protection (in final concentration) in 1 ml Nunc polyethylene containers with  $6.0 \times 10^6$  cells/ml concentration using "Cryoson" programmable freezer (Germany). In the work we approved the cryopreservation programs with following cooling rates:

- 1°C/min down to –40°C with following immersion into liquid nitrogen (1<sup>st</sup> regimen);
- 10°C/min, a 10 min exposure at –40°C with following immersion into liquid nitrogen (2<sup>nd</sup> regimen);
- 40°C/min, a 10 min exposure at –40°C with following immersion into liquid nitrogen (3<sup>rd</sup> regimen).

Suspension was thawed on water bath at 38-40°C during 40-50 sec. After cryopreservation BM cells were washed-out of cryoprotectant by a slow adding of handling medium of equal volume and following centrifuging.

In order to estimate the content of hemopoietic precursors (CFU-GM) we used the method for BM suspension culturing with  $1 \times 10^5$  cells/ml concentration in a semi-liquid agar at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air in atmosphere [9]. Native BM CFU-GM in control animals and those with AA were counted to the 7<sup>th</sup> day of culturing. When investigating dynamics of structure formation by native BM in these animal groups no statistical and significant differences in their amount from 7<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> days were observed. Content of hemopoietic cells-precursors in a cryopreserved BM was determined to the 14<sup>th</sup> day of culturing, taking into account the fact, that CFU-GM proliferative activity after cryopreservation was temporarily inhibited [7]. CFU-GM integral index is the sum of precursors, forming structures up to 20 cells (clusters) and more than 20 ones (colonies). To estimate the hemopoietic cell distribution in BM with a different differentiation degree (less differentiated precursors form colonies, more differentiated ones do clusters [1]) we introduced the index of proliferative activity (IPA CFU-GM), representing a ratio of colony-forming precursors to cluster-forming ones.

Integral efficiency estimation for the used cryopreservation regimens was carried-out using the index of total deviation scope (TDS) [11]. Summary deviation scope is the sum of deviations of selected indices on the control (100%), divided by 100. Results with lower TDS were more satisfactory. The obtained experimental data were statistically processed with "Microsoft Excel 2000" electronic tables.

## Results and discussion

*In vitro estimation of functional state of cryopreserved BM hemopoietic precursors in healthy animals.* After cryopreservation of healthy animals' BM with 1°C/min cooling rate (the 1<sup>st</sup> regimen) the colony-forming activity of hemopoietic

С помощью индекса суммарной степени отклонения (ССО) исследуемых показателей была проведена интегральная оценка эффективности использованных режимов криоконсервирования [11]. Суммарная степень отклонения - это сумма отклонений выбранных показателей от контроля (100%), разделенная на 100. Более удовлетворительными были результаты с меньшей ССО. Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывались с помощью электронных таблиц "Microsoft Excel 2000".

### Результаты и обсуждение

*Оценка in vitro функционального статуса кроветворных предшественников криоконсервированного КМ здоровых животных.* После криоконсервирования КМ здоровых животных со скоростью охлаждения 1°C/мин (режим 1) колониеобразующая активность кроветворных предшественников ранжировалась примерно от 60 до 95% и повышалась по мере увеличения концентрации криопротектора (рис. 1,а), достигая максимального уровня (92,02±3,68 КОЕ-ГМ от контроля) при его 10%-й концентрации. Однако при использовании 5%-го ДМСО отмечено некоторое отклонение ИПА от нормы в сторону повышения содержания колониеобразующих предшественников.

Увеличение скорости замораживания до 10°C/мин (режим 2) сопровождалось снижением сохранности КОЕ-ГМ при использовании всех концентраций ДМСО по сравнению с режимом 1 (рис. 2, а). И в этом случае 10%-й ДМСО обеспечивал максимальную сохранность кроветворных предшественников (64±3,21%), среди которых преобладали колониеобразующие: ИПА был в 1,3 раза выше, чем в контроле.

Максимальное количество кроветворных предшественников в криоконсервированном со скоростью 40°C/мин (режим 3) КМ сохранялось при использовании 7%-го ДМСО (рис. 3, а). Этот показатель практически был идентичным полученному при этой же концентрации ДМСО в режиме 1. При этом, превышая оптимальный при режиме 2 (75,61±3,55 и 64,00±3,21% соответственно;  $p<0,05$ ), он все же уступал максимальному при режиме 1 (75,61±3,55 и 92,34±6,44%,  $p<0,05$ ). Кроме того, при скорости охлаждения 40°C/мин показатель ИПА изменялся в сравнении с контролем: при использовании 5%-го ДМСО он был более чем в 1,5 раза выше, а при 10%-й концентрации - в 2 раза ниже контроля. Существенно, что такие выраженные изменения ИПА при 5 и 10%-й концентрации криопротектора наблюдались на фоне примерно одинакового снижения общего количества КОЕ-ГМ в этих группах (в среднем в 2 раза).

precursors was ranged approximately from 60 to 95% and increased with the augmentation of cryoprotectant concentration (Fig 1, a), by reaching the maximum level (92.02±3.68 CFU-GM of the control) under its 10% concentration. However when using 5% DMSO there was observed a certain IPA deviation on the norm towards an increase in content of colony-forming precursors.

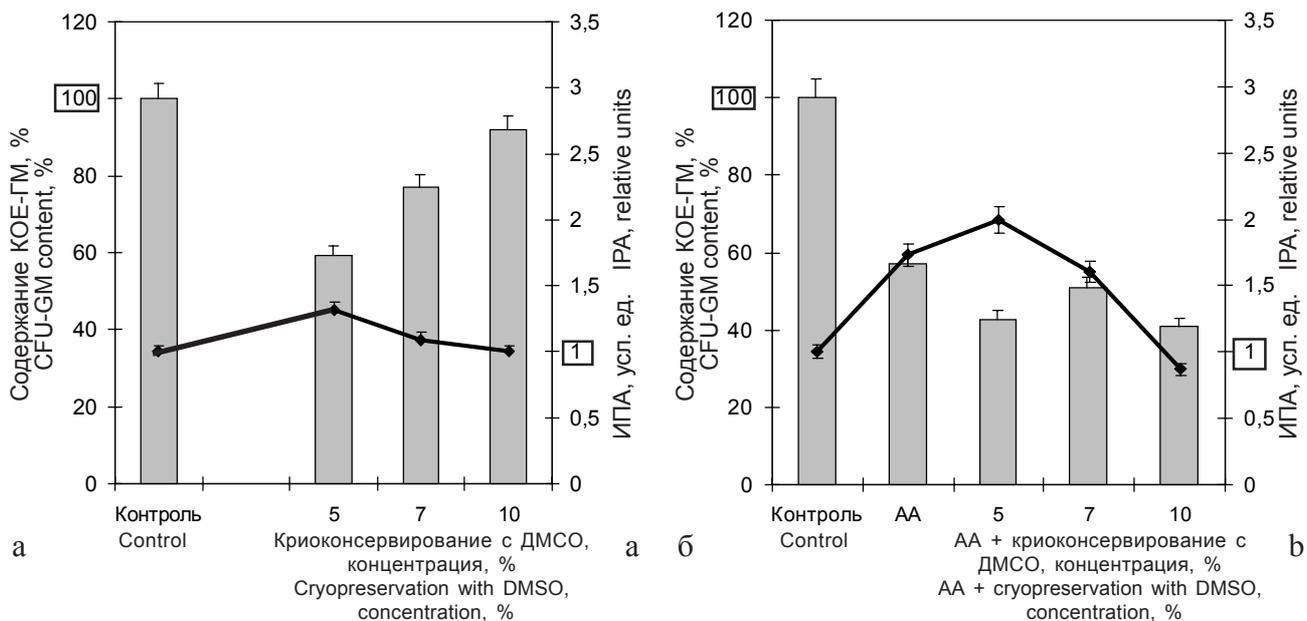
An increase in freezing rate up to 10°C/min (the 2<sup>nd</sup> regimen) was accompanied by a decrease in CFU-GM integrity when using all DMSO concentrations in comparison with the 1<sup>st</sup> regimen (Fig. 2, a). In this case 10% DMSO provided the maximum integrity of hemopoietic precursors (64±3.21%) among which predominated the colony-forming ones: IPA was in 1.3 times higher than in the control.

The maximum amount of hemopoietic precursors in BM, cryopreserved with 40°C/min rate (3<sup>rd</sup> regimen) was preserved when using 7% DMSO (Fig. 3, a). This index was practically identical to that, obtained at the same DMSO concentration with 1<sup>st</sup> regimen. At the same time when exceeding the optimal one at the 2<sup>nd</sup> regimen (75.61±3.55 and 64.00±3.21% correspondingly;  $p<0.05$ ) it was inferior to the maximum at the 1<sup>st</sup> regimen (75.61±3.55 and 92.34±6.44%,  $p<0.05$ ). In addition, at 40°C/min cooling rate the index changed in comparison with the IPA control, which was more than 1.5 times higher during 5% DMSO usage and in twice lower the control at 10% concentration. Of note is that such manifested IPA changes at 5 and 10% cryoprotectant concentrations were observed at the background of approximately equal decrease in total number of CFU-GM in these groups (twice).

*In vitro estimation of functional state of cryopreserved BM hemopoietic precursors in AA animals.* Results of a comparative analysis of BM state in healthy and AA animals demonstrated that the BM colony-forming activity in AA animals was lower by approximately 40% than the control one (57.00±2.85%). In addition, IPA augmentation at AA up to 1.75±0.06% testifies to concentration increase of less differentiated precursors, i.e. forming the colonies in such BM (Fig. 1, b).

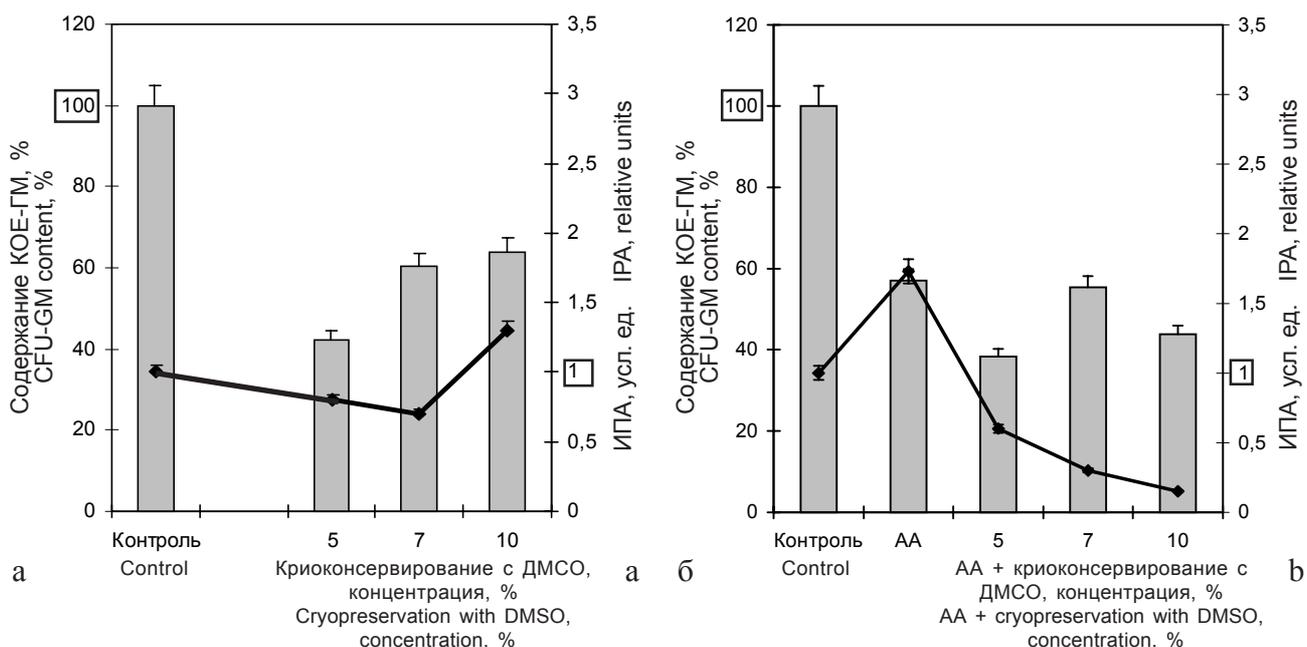
After cryopreserving BM of AA animals with 1°C/min freezing rate with 7% DMSO the CFU-GM and IPA integrity remained at the level of indices before cryopreservation. Two other DMSO concentrations were equally less efficient in providing integrity of total CFU-GM number (reduction by 25-27%) in comparison with the native BM of AA animals. However if at 5% concentration of cryoprotectant the IPA twice exceeded the control (2.00±0.10), at 10% one it was even lower (0.87±0.06; control was accepted for 1).

Dependency of CFU-GM content on cryoprotectant concentration after BM freezing with the 2<sup>nd</sup> regimen (10°C/min rate) was practically the same as at the 1<sup>st</sup> one (Fig. 2, b). However, if judging by IPA, the rate



**Рис. 1.** Сравнительная оценка содержания КОЕ-ГМ и индекса пролиферативной активности КМ здоровых животных (а) и с АА (б) до и после криоконсервирования в режиме 1 (скорость охлаждения 1°С/мин).

**Fig. 1.** Comparative estimation of CFU-GM content and IPA of bone marrow in healthy (a) and AA animals (b) before and after cryopreservation at the 1<sup>st</sup> regimen (1°С/min cooling rate).



**Рис. 2.** Сравнительная оценка содержания КОЕ-ГМ и индекса пролиферативной активности КМ здоровых животных (а) и с АА (б) до и после криоконсервирования в режиме 2 (скорость охлаждения 10°С/мин).

**Fig. 2.** Comparative estimation of CFU-GM content and index of proliferative activity of bone marrow in healthy (a) and AA animals (b) before and after cryopreservation at the 2<sup>nd</sup> regimen (10°С/min cooling rate).

Оценка *in vitro* функционального статуса кроветворных предшественников криоконсервированного КМ животных с АА. Результаты сравнительного анализа состояния КМ здоровых животных и с АА показали, что колониеобразующая активность КМ животных с АА была примерно на 40% ниже, чем контрольного (57,00±2,85%). Кроме того, увеличение ИПА при АА до 1,75±0,06 свидетельствует о повышении в

augmentation obviously inhibited functional potential of colony-forming cell-precursors, moreover in a greater extent within cryoprotectant concentration increase.

At the 3<sup>rd</sup> regimen (Fig. 3, b) the maximum integrity of CFU-GM was provided by 10% DMSO concentration (50.4±4.56%) but not 7% one in contrast to 1<sup>st</sup> regimen (51.2±4.84%) and 2<sup>nd</sup> one (55.37±3.97%). However for the 3<sup>rd</sup> regimen the regularity of reduction

таким КМ концентрации менее дифференцированных предшественников, т.е. формирующих колонии (см. рис. 1, б).

После криоконсервирования КМ животных с АА со скоростью замораживания 1°C/мин только при использовании 7%-го ДМСО сохранность КОЕ-ГМ и ИПА оставались на уровне показателей до криоконсервирования. Две другие концентрации ДМСО были в равной степени менее эффективны в обеспечении сохранности общего количества КОЕ-ГМ (снижение на 25-27%) по сравнению с нативным КМ животных с АА. Однако, если при 5%-й концентрации криопротектора ИПА в два раза превышал контроль (2,00±0,10), то при 10%-й был даже ниже (0,87±0,06; контроль принят за 1).

Зависимость содержания КОЕ-ГМ от концентрации криопротектора после замораживания КМ в режиме 2 (скорость 10°C/мин) практически была такая же, как при режиме 1 (рис. 2, б). Судя по ИПА, повышение скорости явно ингибировало функциональный потенциал клеток-предшественников, формирующих колонии, причем, в большей степени при увеличении концентрации криопротектора.

При режиме 3 (рис. 3, б) максимальную сохранность КОЕ-ГМ, в отличие от режимов 1 (51,24±4,84%) и 2 (55,37±3,97%), обеспечивала не 7, а 10%-я концентрация ДМСО (50,4±4,56% от контроля и 88±3,45% от показателя до замораживания). Однако для режима 3 прослеживалась (характерная для режима 2) закономерность снижения в КМ концентрации более потенциальных предшественников по мере повышения концентрации ДМСО.

Оценка степени модификации функционального статуса *in vitro* КМ с помощью интегрального показателя ССО. После замораживания КМ здоровых животных в режиме 1 лучшие результаты ССО (0,08±0,005) получены при использовании 10%-го ДМСО (рис. 3). При этой же концентрации криопротектора были получены лучшие результаты ССО для КМ, криоконсервированного в режиме 2, однако в данном случае показатель был хуже предыдущего в 5 раз (0,39±0,02). Для режима 3 минимальное отклонение показателя было отмечено с 7%-м ДМСО. В этом случае ССО хотя и была хуже, чем при режиме 1, но лучше, чем при режиме 2 (0,24±0,02 и 0,39±0,02;  $p < 0,05$ ).

Для предшественников КМ животных с АА, наоборот, лучшие результаты ССО при режимах 1 и 2 отмечены с 7%-м ДМСО (0,55±0,04 и 0,52±0,05 соответственно), а при режиме 3 с 10%-м ДМСО (0,55±0,03). При этом, в отличие от КМ здоровых животных, лучшие результаты КМ животных с АА существенно не отличались между собой при

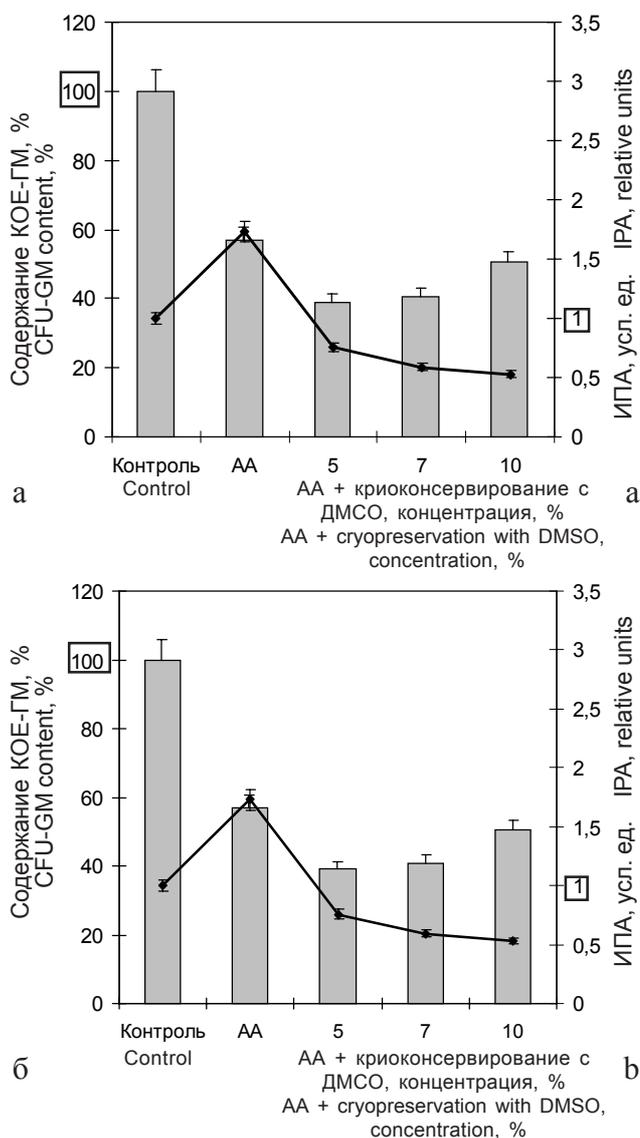


Рис. 3. Сравнительная оценка содержания КОЕ-ГМ и индекса пролиферативной активности КМ здоровых животных (а) и с АА (б) до и после криоконсервирования в режиме 3 (скорость охлаждения 40°C/мин).

Fig. 3. Comparative estimation of CFU-GM content and index of proliferative activity of bone marrow in healthy (a) and AA animals (b) before and after cryopreservation at the 3<sup>rd</sup> regimen (40°C/min cooling rate).

of more potent precursor concentration in BM with an increase in DMSO concentration (typical for the 2<sup>nd</sup> one) was traced.

Estimation of modification degree of functional status *in vitro* of BM using TDS integral index. After freezing healthy animals' BM with the 1<sup>st</sup> regimen the best results of TDS 0.08±0.005 were obtained when using 10% DMSO. Using the same concentration of cryoprotectant the best TDS results were obtained for BM, cryopreserved with the 2<sup>nd</sup> regimen, but in this case the index was 5 times lower than the previous one (0.39±0.02). For the 3<sup>rd</sup> regimen the minimum index deviation was noted at 7% DMSO. In this case even though TDS was lower than at the 1<sup>st</sup> regimen, it was

каждом режиме криоконсервирования. Результаты ССО, отражающие различия ответа предшественников КОЕ-ГМ костного мозга здоровых животных и с АА на изменение условий криоконсервирования, приведены на рис. 4. В частности, зоны варьирования показателей при разных режимах и концентрациях криопротекторов для КМ животных с АА значительно меньше (0,52-0,67), чем для контрольного КМ (0,08-0,60). К тому же для различных режимов вне зависимости от вида КМ наглядно видна максимальная степень отклонения показателя при использовании 5%-го ДМСО. Исходя из этого, в дальнейших исследованиях колониеобразующей активности КМ в системе *in vivo* мы сочли целесообразным использовать только 7 и 10%-ю концентрацию ДМСО.

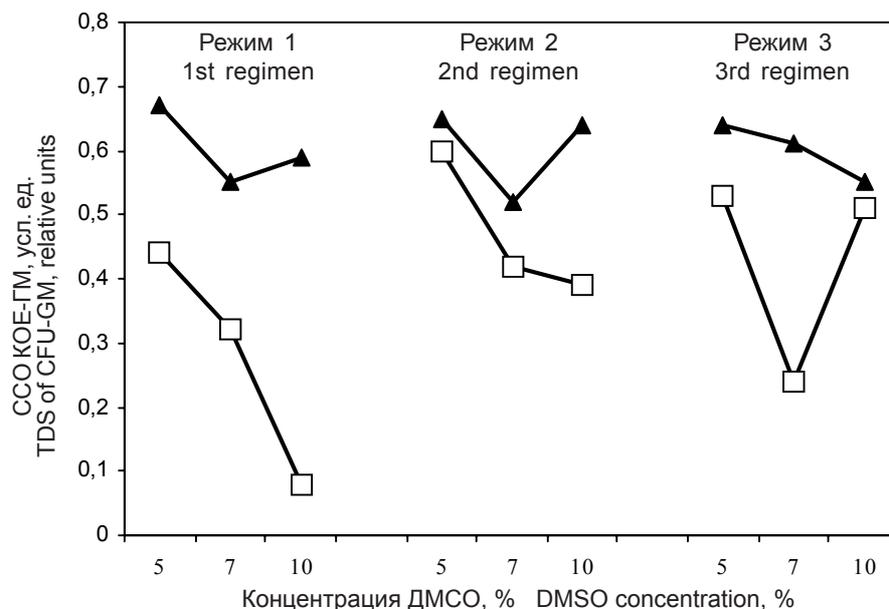
### Выводы

Не меньший интерес представляет проблема оценки особенностей влияния криоконсервирования на функциональный статус СКК костного мозга, формирующих гемopoэтические структуры в системе *in vivo*, т.е. более потентных в сравнении с КОЕ-ГМ. Решение этих вопросов будет представлено во второй части работы.

Установлен факт изменения функционального потенциала кроветворных предшественников (КОЕ-ГМ) КМ при развитии АИЗ и различного их ответа на одни и те же условия криоконсервирования.

### Литература

1. Афанасьев Б.В., Алмазов В.А. Родоначальные кроветворные клетки человека: физиология и патология.— Л.: Наука, 1985.— 204 с.
2. Гембицкий Е.В., Мазуров В.И., Лица А.М. и др. Изменение функциональной активности грануломоноцитопоза у больных ревматоидным артритом // Клини. мед.— 1991.— Т. 69., №3.— С. 51-54.
3. Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис...доктора мед.наук.— Харьков, 1988.— 35 с.
4. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д. Криоконсервирование как возможный метод оценки роли компонентного состава миелотрансплантата в проявлении функциональной



**Рис. 4.** Суммарная степень отклонения (ССО) показателей и индекса пролиферативной активности КОЕ-ГМ криоконсервированного КМ здоровых животных (□) и животных с АА (▲) в зависимости от режима замораживания.

**Fig. 4.** Freezing regimen dependent total deviation scope of CFU-GM indices and index of proliferative activity of cryopreserved BM from healthy animals (□) and those with AA (▲).

higher than at the 2<sup>nd</sup> one (0.24±0.02 and 0.39±0.02; p<0.05).

For BM precursors of AA animals the best TDS results at the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> regimens were conversely observed with 7% DMSO (0.55±0.04 and 0.52±0.05, correspondingly), and with 10% DMSO at the 3<sup>rd</sup> one (0.55±0.03). At the same time in contrast to BM of healthy animals the best results of BM in AA animals did not significantly differ among themselves at each cryopreservation regimen. The TDS results, reflecting differences of response of BM CFU-GM precursors of healthy and AA animals on a change in cryopreservation conditions, are shown in the Fig. 4. In particular, the areas of indices variation at different regimens and cryoprotectant concentrations for BM of AA animals are significantly lower (0.52-0.67) than for the control BM (0.08-0.60). In addition, for different cryopreservation regimens independently on BM type the maximum degree of index deviation when using 5% DMSO is dramatically seen. Proceeding from this we considered as expedient to use only 7 and 10% DMSO concentrations in further investigations of BM colony-forming activity *in vivo*.

### Conclusions

The problem with estimating the peculiarities of cryopreservation influence on functional status of BM SHCs, forming hemopoietic structures *in vivo*, i.e. more potent in comparison with CFU-GM, is of not less interest. Solving of this problem will be shown in the second part of the work.

активности кроветворных клеток // Пробл. криобиологии.– 1994.– №1.– С. 3-13.

5. *Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г., Останков М.В.* Модификация состояния кроветворных клеток костного мозга после криоконсервирования // Материалы Междунар. конф. "Сохранение генетических ресурсов".– Санкт-Петербург, 2004.– С. 783-784.
6. *Грищенко В.И.* Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 7-9.
7. *Дубрава Т.Г.* Эффективность криоконсервирования кроветворных клеток в зависимости от их исходных свойств: Автореф. дис. ...канд. биол. наук.– Харьков, 1986.– 25 с.
8. *Козлова Ю.А., Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Гурина Т.М.* Предпосылки оптимизации метода криоконсервирования костного мозга животных с аутоиммунной патологией // Пробл. криобиологии.– 2004.– №2.– С. 76-83.
9. *Шерешков С.И.* Культивирование гемопоэтических клеток на полутвердых питательных средах // Лаб. дело.– 1974.– №3.– С. 146-150.
10. *Шмаров Д.А.* Оценка пролиферативной активности клеток костного мозга методом проточной цитофлюорометрии // Клин. лаб. диагностика.– 1993.– №5.– С. 40-43.
11. *Пат. №2004031694* Украина, МПК А61В5/00. Спосіб порівняльної оцінки ефективності лікування / А.М. Гольцев, Л.В. Останкова, О.Д. Луценко, Т.Г. Дубрава, Н.М. Бабенко, І.В. Рассоха, А.Ю. Горська, Козлова Ю.О. Заявлено 09.03.04; Опубл. 15.12.2004.– Бюл. №12.– С. 3.12.
12. *Kawamura M., Hisha H., Lia Y. et al.* Distinct qualitative differences between normal and abnormal hemopoietic stem cells in vivo and in vitro // *Stem cells.*– 1997.– №1.– P. 56-62.
13. *Papadaki H.A., Kritikos H.D., Gemetzi C. et al.* Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect // *Blood.*– 2002.– Vol. 99, N5.– P. 1610-1619.
14. *Pearson C.M., Wood F.D.* Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant // *Am. J. Pharmacol.*– 1963.– Vol.42.– P. 73-95.
15. *Porta C., Capolari R., Elis O. et al.* Impaired bone marrow hematopoietic progenitor cell function in rheumatoid arthritis patients candidate to autologous hematopoietic stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplant.*– 2004.– Vol. 33, N7.– P. 721-728.
16. *Tyndall A.* Haematological stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases: first experiences from an international project // *J. Rheumatol.* – 1999.– Vol.38, N4.– P.482-488.

Поступила 21.06.2005

The fact of a change in functional potential of hemopoietic precursors (CFU-GM) at AIDs development and their different response on the same cryopreservation conditions was established.

## References

1. *Afanasiev B.V., Almazov V.A.* Progenitor human hemopoietic cells: physiology and pathology.– Leningrad: Nauka, 1985.– 204 p.
2. *Gembitsky E.V., Mazurov V.I., Lila A.M. et al.* Change in functional activity of granulomonocytopoiesis in patients with rheumatoid arthritis // *Klinicheskaya meditsina.*– 1991.– Vol. 69, N3.– P. 51-54.
3. *Goltsev A.N.* Effect of cryopreservation factors on immunological properties of bone marrow hemopoietic cells: Author's thesis of doctor of medical sciences.– Kharkov, 1988.– 35p.
4. *Goltsev A.N., Lutsenko E.D.* Cryopreservation as a possible method of estimation of the role of myelograf component composition in the functional activity of hemopoietic cells // *Problems of Cryobiology.*– 1994.– N1.– P. 3-13.
5. *Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dubrava T.G., Ostankov M.V.* Modification of state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation // *Proceedings of International Conference "Preservation of genetic resources".*– Saint-Petersburg, 2004.– P. 783-784.
6. *Grischenko V.I.* The role of cryobiology in creation of biotechnologies for cellular and tissue transplantation // *Problems of Cryobiology.*– 2001.– N3.– P. 7-9.
7. *Dubrava T.G.* Efficiency of cryopreservation of hemopoietic cells depending on their initial properties: Author's thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 1986.– 25 p.
8. *Kozlova Yu.A., Goltsev A.N., Dubrava T.G., Gurina T.M.* Premises for optimizing the method of bone marrow cryopreservation in animals with autoimmune pathologies // *Problems of Cryobiology.*– 2004.– N2.– P. 76-83.
9. *Shereshkov S.I.* Culturing of hemopoietic cells on semi-solid nutrient media // *Lab. Delo.*– 1974.– N3.– P. 146-150.
10. *Shmarov D.A.* Estimation of proliferative activity of bone marrow cells using flow cytometry method // *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.*– 1993.– N5.– P. 40-43.
11. *Patent N2004031694* Ukraine, IPC A61B5/00. Way for comparative estimation of treatment efficiency / A.N. Goltsev, L.V. Ostankova, O.D. Lutsenko, T.G. Dubrava, N.N. Babenko, I.V. Rassokha, A.Yu. Gorskaya, Yu.O. Kozlova. Filed 09.03.04; Published 15.12.2004.– Bull. N12.– P.3.12.
12. *Kawamura M., Hisha H., Lia Y. et al.* Distinct qualitative differences between normal and abnormal hemopoietic stem cells in vivo and in vitro // *Stem cells.*– 1997.– №1.– P. 56-62.
13. *Papadaki H.A., Kritikos H.D., Gemetzi C. et al.* Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect // *Blood.*– 2002.– Vol. 99, N5.– P. 1610-1619.
14. *Pearson C.M., Wood F.D.* Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant // *Am. J. Pharmacol.*– 1963.– Vol.42.– P. 73-95.
15. *Porta C., Capolari R., Elis O. et al.* Impaired bone marrow hematopoietic progenitor cell function in rheumatoid arthritis patients candidate to autologous hematopoietic stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplant.*– 2004.– Vol. 33, N7.– P. 721-728.
16. *Tyndall A.* Haematological stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases: first experiences from an international project // *J. Rheumatol.* – 1999.– Vol.38, N4.– P.482-488.

Accepted in 21.06.2005