

Сохранность клеток костного мозга собак после экспозиции с криопротекторами и замораживания в жидком азоте

UDC 615.361.018.46.014.41:57.084:547.42

L.A. VODOPYANOVA*, G.F. ZHEGUNOV

Integrity of Canine Bone Marrow Cells after Cryoprotectant Exposure and Freezing in Liquid Nitrogen

Исследовали сохранность клеток костного мозга собак после экспозиции с криопротекторами (диметилсульфоксид, полиэтиленоксид с молекулярной массой 400, глицерин) и криоконсервирования в жидком азоте. Выявили, что сохранность клеток костного мозга собак после замораживания в жидком азоте без криопротектора 6%. Наиболее эффективным при криоконсервировании был 7%-й раствор диметилсульфоксида, сохраняющий более 80% клеток.

Ключевые слова: костный мозг, криоконсервирование, диметилсульфоксид, полиэтиленоксид, глицерин.

Досліджували збереженість клітин кісткового мозку собак після експозиції з криопротекторами (диметилсульфоксид, поліетиленоксид з молекулярною масою 400, гліцерин) та криоконсервування у рідкому азоті. Виявили, що збереженість клітин кісткового мозку собак після криоконсервування у рідкому азоті без криопротектора 6%. Найбільш ефективним при криоконсервуванні виявився 7%-й розчин ДМСО, який зберігає більш ніж 80% клітин.

Ключові слова: кістковий мозок, криоконсервування, диметилсульфоксид, поліетиленоксид, гліцерин.

Canine bone marrow integrity was studied after exposure with cryoprotectants (dimethylsulfoxide, polyethylene oxide with molecular mass of 400, glycerol) and cryopreservation in liquid nitrogen. The integrity of canine bone marrow cells after freezing in liquid nitrogen with no cryoprotectant has been revealed as 6%. During cryopreservation the most effective was found 7% dimethylsulfoxide, preserving more than 80% of cells.

Key-words: bone marrow, cryopreservation, dimethylsulfoxide, polyethylene oxide, glycerol.

Одним из способов восстановления кроветворения при его нарушении является трансплантация кроветворной ткани, в частности костного мозга [17]. На сегодняшний день единственным способом хранения клеток костного мозга (ККМ) является низкотемпературное консервирование, позволяющее хранить материал до трансплантации [14, 15, 17].

Методы терапии с трансплантацией, хотя и являются новыми в ветеринарии, но уже показали свою эффективность в экспериментах [8, 13, 16], что стимулирует проведение дальнейших исследований в данной области и требует создания запасов гемопоэтической ткани.

Цель работы – изучение сохранности ККМ собак на разных этапах криоконсервирования с криопротекторами.

Материалы и методы

Клетки костного мозга получали от 6-ти половозрелых самцов собак 3-4 лет методом костно-мозговой пункции [10, 11], проведенной в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001). Кон-

Харьковская государственная зооветеринарная академия

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: Харьковская государственная зооветеринарная академия, пгт. М. Даниловка, Харьковская обл., Украина, 62341; электронная почта: vodopyanova@mail.ru

One of the ways to restore haemopoiesis during its disorder is transplantation of haemopoietic tissue, in particular, bone marrow. Nowadays the only method for bone marrow (BM) cell preservation is low temperature preservation, allowing the storage of the material before transplantation [14, 15, 17].

Therapeutic methods with transplantation, though being new ones in veterinary, but have already demonstrated their efficiency in experiments [8, 13, 16], that stimulates the further studies in this field and requires the creation of stocks of haemopoietic tissue.

Research aim is to investigate the integrity of canine bone marrow cells at different cryopreservation stages with cryoprotectants.

Materials and methods

Bone marrow cells were harvested from 6 mature dog males of 3-4 years by bone marrow puncture [11] performed according to the “General principles of experiments in animals”, approved by the 1st National Congress in Bioethics (Kiev, 2001). Cell concentration in suspension was normalized to common value (10⁷/ml) by dilution with handling medium, comprising medium 199 (“PanEco”, Russia), sodium citrate solution, fetal calf blood serum (“PanEco”, Russia).

Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov Region, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: Kharkov State Zooveterinary Academy, M. Danilovka, Kharkov region, Ukraine, 62341, e-mail: vodopyanova@mail.ru

центрацию клеток в суспензии приводили к единому значению (10^7 /мл) путем разведения рабочей средой, состоящей из среды 199 (“Пан-Эко”, Россия), раствора цитрата натрия, эмбриональной телячьей сыворотки крови (“Пан-Эко”, Россия).

Клетки костного мозга собак криоконсервировали с растворами криопротекторов в следующих конечных концентрациях: диметилсульфоксид (ДМСО) – 5; 7; 10%, полиэтиленоксид с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) – 10; 15; 20%, глицерин – 10; 20; 30%. Время инкубации суспензии ККМ с ДМСО составляло 10 мин, с глицерином и ПЭО-400 – 30 мин при температуре 4°C [3].

Замораживали ККМ в пластиковых контейнерах объемом 1,5 мл (“EPPENDORF”, СРЕКТАР) по двухступенчатой программе [5, 7, 9, 15, 17]. Размораживали пробы на водяной бане 41°C при постоянном покачивании в течение 1-3 минут.

Криопротекторы из суспензии ККМ удаляли путем добавления рабочей среды с дальнейшим центрифугированием при 4°C, 90g. Осадок ресуспендировали в 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки крови [4, 6].

Для оценки сохранности ККМ применяли прижизненную окраску трипановым синим [5, 15]. Пробы изучались в световом микроскопе при увеличении 400 (Biolux, Германия). Количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева [1].

По этой схеме определяли сохранность ККМ как после действия криопротекторов без замораживания, так и после замораживания.

Статистическую обработку данных проводили по методу Стьюдента-Фишера с использованием программы “Stat Graphics plus”.

Результаты и обсуждение

Экспериментально установлено, что все исследованные криопротекторы на стадии инкубации вызывают снижение сохранности ККМ собак, на этом этапе она составила от $87,6 \pm 1,23\%$ до $92,66 \pm 0,51\%$ для различных криопротекторов (рис. 1).

Наименьшее воздействие при инкубации оказали 10%-е растворы глицерина и ПЭО-400 (до 92% сохранности ККМ собак), а также 5%-й раствор ДМСО (90%).

Замораживание суспензии ККМ собак без криопротекторов негативно отражается на жизнеспособности клеток (сохранность составляет 6%), что делает суспензию непригодной для трансплантации и обуславливает применение криозащиты (рис. 2).

Наиболее эффективным криопротектором при замораживании оказался ДМСО. В частности, после замораживания с ДМСО в 7%-й concentra-

Canine bone marrow cells were cryopreserved with cryoprotectant solutions with following final concentrations: dimethylsulfoxide (DMSO) – 5, 7, 10%; polyethylene oxide with molecular mass of 400 (PEO-400) – 10, 15, 20%; glycerol – 10, 20, 30%. Time of incubation of CBM suspension with DMSO made 10 min, the one with glycerol and PEO-400 was 30 min at 4°C [3].

BM cells were frozen in 1.5 ml plastic containers (“Eppendorf”, SPEKТАR) according to two-step program [5, 7, 9, 15, 17]. Samples were thawed on water bath at 41°C with constant shaking for 1-3 min.

Cryoprotectants were removed out of BMC suspension by adding handling medium with further centrifugation at 4°C, 90g. Sediment was re-suspended in 1ml fetal calf blood serum [4, 6].

To assess the BM cell integrity vital staining with trypan blue [5, 15] was used. Samples were investigated with light microscope at 400 magnification (Biolux, Germany). Number of cells in suspension was counted in Goryaev’s chamber [1].

According to this protocol there was found the BM cell integrity after the effect of cryoprotectants with or without freezing.

The data were statistically processed with the method of Student-Fisher using “Stat Graphics plus” software.

Results and discussion

The experiments have shown that all studied cryoprotectants at incubation stage cause the reduction of canine BM cell integrity, at this stage it made from

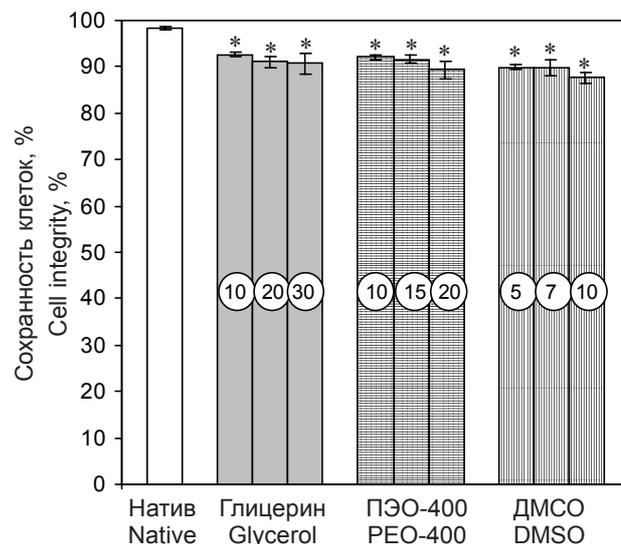
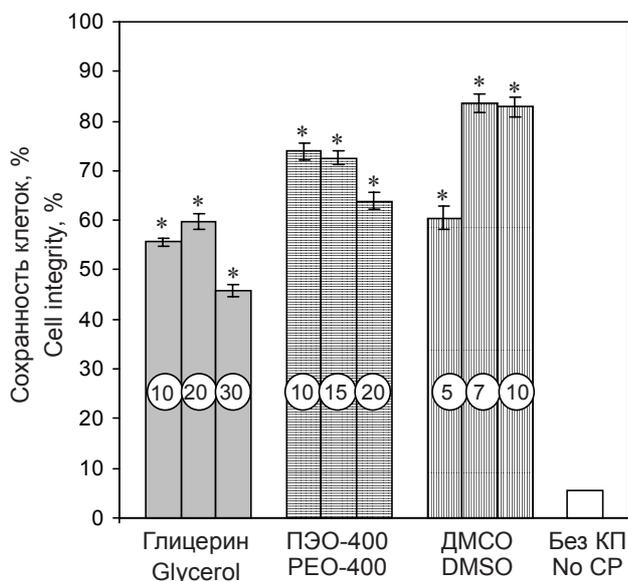


Рис. 1. Показатели сохранности ККМ собак после инкубации с криопротекторами (концентрация в % указана на столбцах): * – достоверные различия в сравнении с нативными клетками, $p < 0,001$.

Fig. 1. Integrity indices of canine bone marrow cells after incubation with cryoprotectants (concentrations are shown inside the columns): * – statistical and significant differences if compared with native cells, $p < 0.001$.



ции сохранность клеток составляла $83,51 \pm 1,9\%$ по отношению к контролю. ПЭО-400 и глицерин были менее эффективными: растворы глицерина обеспечивают сохранность до 59%, а ПЭО-400 – до 74% ККМ собак. Наименьший показатель сохранности клеток ($45,85 \pm 1,3\%$) среди изученных вариантов наблюдался после замораживания под защитой 30%-го глицерина (рис. 2).

Известно, что высокие концентрации ДМСО обладают некоторыми токсическими свойствами по отношению к ККМ [12]. Но концентрацию 5-7%-го ДМСО при кратковременной экспозиции можно считать практически нетоксичной для гемопоэтических клеток [7].

Глицерин оказался менее эффективным криопротектором чем ДМСО. Вероятно, это связано с тем, что проницаемость плазматических мембран для глицерина при температуре, близкой к 0°C , у большинства типов клеток существенно снижена, и в этом случае глицерин действует только как экзоцеллюлярный криопротектор [2]. Видимо, этим можно объяснить невысокую сохранность ККМ собак после криоконсервирования в присутствии глицерина (рис. 2).

Выводы

Установлено, что сохранность клеток костного мозга собак, замороженных в жидком азоте без применения криопротекторов, чрезвычайно мала, что обуславливает необходимость применения криозащиты.

Все исследованные криопротекторы уже на стадии инкубации оказывают влияние на сохранность ККМ собак. Более эффективным криопротектором оказался 7%-й ДМСО, обеспечивающий наибольшую сохранность клеток после замораживания.

Рис. 2. Показатели сохранности ККМ собак, после замораживания в жидком азоте под защитой криопротекторов (концентрация в % указана на столбцах) и без криопротектора: КП – криопротектор; * – достоверные различия в сравнении с данными после инкубации, $p < 0,001$.

Fig. 2. Integrity indices of canine bone marrow cells after freezing in liquid nitrogen with cryoprotectants (concentrations are shown inside the columns) and with no cryoprotectant: CP – cryoprotectant, * – statistical and significant differences if compared with the post-incubation data, $p < 0,001$.

$87.6 \pm 1.23\%$ to $92.66 \pm 0.51\%$ for different cryoprotectants (Fig. 1).

The least effect during incubation has been shown by 10% glycerol and PEO-400 (up to 92% survived canine BMCs) as well as 5% DMSO (90%).

Canine BMC suspension freezing with no cryoprotectants negatively affects cell viability (integrity is 6%), that makes the suspension inapt for transplantation and stipulates application of cryoprotection (Fig. 2).

DMSO occurred to be the most effective cryoprotectant during freezing. In particular, after freezing with DMSO under 7% concentration the cell integrity made $83.51 \pm 1.9\%$ regarding the control. PEO-400 and glycerol were less effective: glycerol solutions provide the integrity of canine BMCs up to 59% and up to 74% for PEO-400. Less index of cell integrity ($45.85 \pm 1.3\%$) among studied variants was observed after freezing under 30% glycerol protection (Fig. 2).

It is known high DMSO concentrations possess some toxic properties in respect of BMCs [12]. However concentration of 5-7% DMSO at short-term exposure may be considered as practically non-toxic for hemopoietic cells [7].

Glycerol occurred to be less effective if compared with DMSO. This is likely related to the fact that permeability of plasma membranes for glycerol at the temperatures close to zero for the majority of cells is significantly reduced and in this case glycerol acts only as exocellular cryoprotectant [2]. Maybe this explains low integrity of canine BMCs after cryopreservation in glycerol presence (Fig. 2).

Conclusions

It is established that the integrity of canine bone marrow cells frozen in liquid nitrogen without cryoprotectants is extremely low, i.e. the presence of cryoprotectants is required.

All studied cryoprotectants even at incubation stage affect canine BM cell integrity. The most effective cryoprotectant occurred to be 7% DMSO, providing the highest cell integrity after freezing.

Литература

1. Байер В.А. Краткое пособие по гематологии. Изд. 3-е, испр. и доп.– Л.: Медицина, 1973.– 231 с.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 430 с.
3. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Кривоансерванты.– Киев: Наук. думка, 1979.– 197 с.
4. Козлова Ю.А., Гольцев А.Н., Останков М.Н. Влияние изолированных физико-химических факторов кривоансервирования на клетки костного мозга с разным исходным структурно-функциональным статусом // Пробл. кробиологии. – 2003. – №4. – С. 3-11.
5. Пушкарь Н.С., Цуцаева А.А., Иткин Ю.А., Шраго М.И. Консервирование костного мозга при ультранизких температурах с ПЭО-400: Метод. рекомендации.– М., 1984.– 11 с.
6. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. Кривоансервирование клеточных суспензий.– Киев: Наукова думка, 1983.– 240 с.
7. Galmes A., Besalduch J., Bargay J. et al. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at –80 degrees C without rate-controlled freezing // Transfusion.– 1996.– Vol. 36, N9.– P. 794-797.
8. Hartuett B.J., Yao D., Suter S.E. et al. Transplantation of X-linked severe combined immunodeficient dogs with CD34⁺ bone marrow cells // Biol. Blood Marrow Transplant.– 2002.– Vol. 8, N4. – P. 188-197.
9. Kawano Y., Lee C.L., Watanabe T., Abe T. et al. Cryopreservation of mobilized blood stem cells concentration without the use of a programmed freezer // Ann. Hematol.– 2004.– Vol. 83, N1.– P. 50-54.
10. Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K. et al. A new method for bone marrow harvesting // Stem cells.– 2000.– Vol. 18, N6.– P. 453-456.
11. Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K. et al. Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeys at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT // Stem cells. – 2002. – Vol. 20. – P. 155-162.
12. Rowley S.D., Anderson G.L. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells // Bone Marrow Transplant.– 1993.– Vol. 11, N5.– P. 389-393.
13. Rozhdestvensky L., Sernichenko A. Experimental approach to improving early postirradiation restoration in the hematopoietic system of irradiated canines // J. Radiat. Res. (Tokyo).– 2004.– Vol. 45, N1.– P. 45-51.
14. Spurr E.E., Wiggins N.E., Marsden K.A. et al. Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5-14 years) cryostorage // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, N3.– P. 210-217.
15. Stiff P.J., Murgo A.J., Zaroulis C.G. et al. Ulfracationated human marrow cell cryopreservation with dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch // Cryobiology.– 1983.– Vol. 20, N1.– P. 17-24.
16. Tacau A., Nash R.A., Zaucha J.M. et al. Adoptive immunotherapy to increase the level of donor hematopoietic chimerism after nonmyeloablative marrow transplantation for severe canine hereditary hemolytic anemia // Biol. Blood Marrow Transplant.– 2003.– Vol. 9, N11.– P. 674-682.
17. Van de Ouweland F., De Witte T., Geerdink P., Haanen C. Enrichment and cryopreservation of bone marrow progenitor cells for autologous reinfusion // Cryobiology.– 1982.– Vol. 19, N3.– P. 292-298.

References

1. Bayer V.A. Brief manual on haematology.– Leningrad: Meditsina, 1973.– 231 p.
2. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 430 p.
3. Belous A.M., Shrago M.I., Pushkar N.S. Cryoprotectants. – Kiev: Naukova Dumka, 1979.– 197p.
4. Kozlova Yu.A., Goltsev A.N., Ostankov M.V. Influence of certain physical and chemical factors of cryopreservation on bone marrow cells with various initial structural and functional status // Problems of Cryobiology.– 2003.– N4.– P. 3-11.
5. Pushkar N.S., Tsutsayeva A.A., Itkin Yu.A., Shrago M.I. Preservation of bone marrow under ultra-low temperatures with PEO-400: Methodical recommendations. Moscow, 1984.– 11p.
6. Tsutsayeva A.A., Agranenko V.A., Fedorova L.I. Cryopreservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova Dumka, 1983.– 240 p.
7. Galmes A., Besalduch J., Bargay J. et al. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at –80 degrees C without rate-controlled freezing // Transfusion.– 1996.– Vol. 36, N9.– P. 794-797.
8. Hartuett B.J., Yao D., Suter S.E. et al. Transplantation of X-linked severe combined immunodeficient dogs with CD34⁺ bone marrow cells // Biol. Blood Marrow Transplant.– 2002.– Vol. 8, N4. – P. 188-197.
9. Kawano Y., Lee C.L., Watanabe T., Abe T. et al. Cryopreservation of mobilized blood stem cells concentration without the use of a programmed freezer // Ann. Hematol.– 2004.– Vol. 83, N1.– P. 50-54.
10. Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K. et al. A new method for bone marrow harvesting // Stem cells.– 2000.– Vol. 18, N6.– P. 453-456.
11. Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K. et al. Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeys at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT // Stem cells. – 2002. – Vol. 20. – P. 155-162.
12. Rowley S.D., Anderson G.L. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells // Bone Marrow Transplant.– 1993.– Vol. 11, N5.– P. 389-393.
13. Rozhdestvensky L., Sernichenko A. Experimental approach to improving early postirradiation restoration in the hematopoietic system of irradiated canines // J. Radiat. Res. (Tokyo).– 2004.– Vol. 45, N1.– P. 45-51.
14. Spurr E.E., Wiggins N.E., Marsden K.A. et al. Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5-14 years) cryostorage // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, N3.– P. 210-217.
15. Stiff P.J., Murgo A.J., Zaroulis C.G. et al. Ulfracationated human marrow cell cryopreservation with dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch // Cryobiology.– 1983.– Vol. 20, N1.– P. 17-24.
16. Tacau A., Nash R.A., Zaucha J.M. et al. Adoptive immunotherapy to increase the level of donor hematopoietic chimerism after nonmyeloablative marrow transplantation for severe canine hereditary hemolytic anemia // Biol. Blood Marrow Transplant.– 2003.– Vol. 9, N11.– P. 674-682.
17. Van de Ouweland F., De Witte T., Geerdink P., Haanen C. Enrichment and cryopreservation of bone marrow progenitor cells for autologous reinfusion // Cryobiology.– 1982.– Vol. 19, N3.– P. 292-298.

Accepted in 12.01.2006.

Поступила 12.01.2006