

Роль переохлаждения в сохранении клоногенных свойств фибробластоподобных клеток-предшественников эмбриональной печени человека после криоконсервирования

UDC 615.361.36.013.014.41

N.G. SKOROBOGATOVA*, V.P. GRISCHUK, A.YU. PETRENKO

Role of Overcooling in Preserving Clonogenic Properties of Fibroblast-Like Progenitor Cells of Human Fetal Liver After Cryopreservation

Исследовано влияние различных условий замораживания на жизнеспособность клеток эмбриональной печени человека (ЭПЧ) и колониобразующую активность фибробластоподобных клеток-предшественников (ФКП) ЭПЧ. Установлено, что данный тип предшественников высокочувствителен к повреждающему действию переохлаждения. Снижение переохлаждения при медленном трехэтапном замораживании позволяет успешно криоконсервировать ФКП в составе первичной суспензии клеток ЭПЧ с сохранением клоногенных свойств.

Ключевые слова: криоконсервирование, фибробластоподобные клетки-предшественники, эмбриональная печень человека.

Досліджено вплив різних умов заморожування на життєздатність клітин ембріональної печінки людини (ЕПЛ) і колонієутворюючу активність фібробластоподібних клітин-попередників (ФКП) ЕПЛ. Встановлено, що даний тип попередників високочутливий до дії переохолодження, що їх ушкоджує. Зниження переохолодження при повільному трьохетапному заморожуванні дозволяє успішно криоконсервувати ФКП у складі первинної суспензії клітин ЕПЛ зі збереженням клоногенних властивостей.

Ключові слова: криоконсервування, фібробластоподібні клітини-попередники, ембріональна печінка людини.

Effect of different freezing conditions on human fetal liver (HFL) cell viability and colony-forming activity of HFL fibroblast-like progenitor cells (FPCs) was investigated. This progenitor type was established to be a high sensitive to a damaging effect of overcooling. Overcooling reduction at a slow three-step freezing enables a successful cryopreservation of FPCs in primary suspension of HFL cells with preservation of their clonogenic properties.

Key-words: cryopreservation, fibroblast-like progenitor cells, human fetal liver.

В настоящее время оптимизация протоколов криоконсервирования клеток-предшественников (КП) направлена на обеспечение сохранности мультипотентных стволовых клеток (СК). Из-за низкого содержания СК в первичной суспензии предпринимаются попытки получения отдельных фракций клеток или наращивания определенного типа клеток в культуре. Однако известно, что предварительные манипуляции по обогащению суспензий клетками с заданными характеристиками сопровождаются дополнительными физико-химическими воздействиями, негативно отражающимися на результатах последующего криоконсервирования клеток. Кроме того, выделенные из ткани СК и КП обладают свойствами, которые могут изменяться в ходе культивирования *in vitro*. В связи с этим поиск оптимальных условий замораживания различных типов стволовых и коммитированных КП в составе первичных суспензий представляет особый интерес для

Nowadays optimising the protocols for progenitor cells (PCs) cryopreservation is oriented to provide the multipotent stem cells (SCs) integrity. Due to a low content of SCs in primary suspension the attempts to procure separate cell fractions or growing certain cell type in a culture are made. However the preliminary manipulations on enriching suspension with cells, having predetermined characteristics are known to be accompanied with additional physical and chemical effect, which can negatively affect further cell cryopreservation outcomes. In addition, isolated SCs and PCs from tissue have the properties, which may change during *in vitro* cultivation. In this connection the search for optimal freezing conditions for various PCs as a part of primary cell suspension is of interest both for studying initial level of stem and committed cells cryosensitivity and establishing low temperature bank as well.

Our work was targeted to investigate the effect of different cryopreservation conditions on fibroblast-like

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

изучения криочувствительности различных типов клеток, а также разработки эффективных способов их криоконсервирования.

Цель работы – исследование влияния различных условий криоконсервирования на сохранность и клоногенные свойства фибробластоподобных клеток предшественников эмбриональной печени человека (ФКП ЭПЧ).

Материалы и методы

В эксперименте использовали фрагменты ЭПЧ 8-11 недель гестации, полученные после планового прерывания беременности по социальным показаниям и информированного письменного согласия донора на применение биоматериала в исследовательских целях. Фрагменты печени транспортировали на льду в стерильных флаконах с сахарозо-солевым раствором, содержащим 100 ед/мл канамицина [8]. Первичные суспензии клеток ЭПЧ были получены ферментативным способом [2] в стерильных условиях. Для предварительной оценки жизнеспособности клеток ЭПЧ до и после криоконсервирования использовали прижизненное окрашивание трипановым синим [9].

Адгезивная способность клеток ЭПЧ и функциональная активность стромальных ФКП были исследованы в условиях монослойного культивирования в среде α MEM, содержавшей 20% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота и антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 50 ед/мл). Колониеобразующую активность ФКП оценивали при культивировании по методу, разработанному для стромальных клеток постнатального костного мозга (КМ) [6] и модифицированному нами для ЭПЧ [1]. Прижизненное наблюдение за культивируемыми клетками осуществлялось с помощью бинокулярного инвертированного микроскопа (CETI, Бельгия). Эффективность колониеобразования определяли на 14-е сутки культивирования по отношению числа колониеобразующих единиц фибробластов (KOE_{Φ}) к количеству эксплантированных жизнеспособных клеток и выражали в процентах [5]. Пассирование первичной культуры проводили при достижении 50-70% конфлуентного монослоя. После удаления среды культивирования к клеткам добавляли 0,25%-й раствор трипсина и инкубировали 5 мин при 37°C, затем действие фермента инактивировали средой культивирования, содержащей ЭС. Пересев клеток проводили в аналогичных условиях культивирования в среду α MEM с 10%-м содержанием ЭС.

Для оценки влияния контакта клеток ЭПЧ с криопротектором ДМСО на жизнеспособность клеток часть первичной суспензии инкубировали при 4°C в течение 30 мин с раствором ДМСО (5 и 10%).

progenitor cells from human embryonic liver (HEL FPCs) integrity and clonogenic properties.

Materials and methods

HEL fragments of 8-11 gestation weeks, obtained after planned abortion by social indications and donor's informed consent for the biological material application in research purposes were used in the experiment. Liver fragments were transported on ice in sterile flasks with sucrose-saline solution, containing 100 units/ml of kanamycin [8]. Primary HEL cells suspensions were procured using enzymatic method [2] under sterile conditions. For preliminary evaluation of HEL cell viability prior to and following cryopreservation we used supravital staining with trypan blue [9].

Adhesive capability of HEL cells and functional activity of stromal FPCs were investigated under monolayer culturing conditions in α MEM medium, containing 20% cattle embryonic serum (ES) and antibiotics (penicillin and streptomycin by 50 units/ml). FPCs colony-forming activity was estimated during cultivation according to the method, developed for postnatal bone marrow (BM) stromal cells [6] and modified by us for HEL [1]. Supravital observation for cultured cells was carried-out using binocular inverted microscope (CETI, Belgium). Colony-formation efficiency was determined to the 14th day of culturing by the ratio of colony forming units of fibroblasts (CFU_f) to the amount of explanted viable cells and expressed in percentage [5]. Passaging of primary culture was performed when achieving 50-70% confluent monolayer. After removing cultivation medium we added 0.25% trypsin solution into cells and incubated for 5 min at 37°C, then the enzyme action was inactivated with ES-contained cultivation medium. Cell reinoculation was done under similar cultivation conditions into the α MEM medium with 10% ES content.

To estimate the influence of HEL cells contact with DMSO cryoprotectant on cell viability a part of primary suspension was incubated within 30 min with DMSO solutions (5 and 10%) at 4°C.

Cryopreservation of HEL cell primary suspensions was performed in "Corning" cryovials in cultivation medium with 20% ES and final 5 and 10% DMSO concentrations. Five variants of two- and three-step freezing were used in the work.

1st-2nd variants are those of two-step freezing:

1st variant: at the first stage cryovials with frozen cell suspension were immersed into alcohol bath, cooled down to -28°C and exposed for 20 min. Then vials were rapidly transferred into liquid nitrogen [8];

2nd variant: cryovials were placed into Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene) with isopropyl alcohol and left at -80°C for 4 hrs [5]. At the same time at

Криоконсервирование первичных суспензий клеток ЭПЧ осуществляли в криопробирках "Corning" в среде культивирования с 20%-й ЭС и конечной концентрацией ДМСО 5 и 10 %. В работе исследовали пять вариантов двух- и трехэтапного замораживания.

I – II – варианты двухэтапного замораживания:

I вариант – на первом этапе криопробирки с замораживаемой клеточной суспензией погружали в спиртовую баню, охлажденную до -28°C и выдерживали в течение 20 мин. Затем пробы быстро переносили в жидкий азот [8];

II вариант – криопробирки помещали в криоконтейнер Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene) с изопропиловым спиртом и оставляли при -80°C на 4 ч [5]. При этом на первом этапе обеспечивалось охлаждение со скоростью около $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -80°C ; на втором этапе пробы быстро переносили в жидкий азот.

Варианты (III–V) трехэтапного замораживания проводили на замораживателе ЗП 10 (СКТБ ИПКиК НАН Украины) по нескольким программам:

III вариант – первый этап проводили со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -40°C , второй – со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -80°C , третий – осуществляли быстрое погружение в жидкий азот.

IV вариант – первый этап проводили со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -20°C , второй – со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -60°C , третий – осуществляли быстрое погружение в жидкий азот.

V вариант – первый этап (с инициацией кристаллообразования – сидингом) проводили со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -20°C , второй – со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -60°C , третий – осуществляли быстрое погружение в жидкий азот.

Криоконсервированные образцы хранили в жидком азоте в течение 2-4 недель. Отогрев осуществляли на водяной бане при 37°C [10]. Из размороженных суспензий криопротектор удаляли путем медленного добавления 10-кратного объема культуральной среды, содержащей 10% ЭС. После центрифугирования в течение 10 мин при 200 г осадок ресуспендировали в новой порции среды и проводили дальнейшие исследования в условиях культивирования.

Для статистической обработки результатов использовали непараметрический критерий Уилкоксона. Результаты представлены как $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

Жизнеспособность свежееизолированных клеток ЭПЧ ($n=7$) составляла в среднем $94,6 \pm 0,9\%$. При кратковременном контакте с криопротектором ДМСО (5 и 10%) не наблюдалось снижение жизнеспособности клеток ЭПЧ (табл. 1). Ранее мы

first stage cooling with approximately $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ down to -80°C was provided; at the second one the samples were fast transferred into liquid nitrogen.

3rd-5th variants of three-step freezing were realised with ZP 10 freezer (Special Design & Construction Bureau with Experimental Unit of Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) by several programs:

3rd variant: the first stage was realised with $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ rate down to -40°C , the second one was done with $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ down to -80°C and rapid immersion into liquid nitrogen made the third one.

4th variant: the first stage was realised with $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ rate down to -20°C , the second one was done with $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ down to -60°C and the third one comprised rapid immersion into liquid nitrogen.

5th variant: the first stage (with initiation of crystal formation-seeding) was realised with $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ rate down to -20°C , the second one was done with $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ down to -60°C and fast immersion into liquid nitrogen make the third one.

Cryopreserved samples were stored in liquid nitrogen within 2-4 weeks. Thawing was done on water bath at 37°C [10]. Cryoprotectant from frozen-thawed suspensions was removed by slow adding a 10-fold volume of 10%-ES-contained cultural medium. After centrifuging within 10 min at 200 g the sediment was resuspended in new portion of medium and further research under cultivation conditions was carried-out.

Results were statistically processed with Wilkison's non-parametric criterion. Results are presented as $M \pm m$.

Results and discussion

Viability of freshly isolated HEL cells ($n=7$) made $94,6 \pm 0,9\%$. At a short-term contact with DMSO (5 or 10%) no decrease in HEL cell viability was observed (Table 1). Previously we have established that after cryopreserving primary suspension of studied cells by the protocol, providing the integrity for hemopoietic granulocyte-macrophage HEL PCs, the stromal precursors are damaged [3]. In spite of the fact, that the attachment efficiency of HEL cryopreserved cells did not reduce, there were noted morphological changes in cells after explantation under monolayer culturing conditions, which were manifested in disorder of flattening process on a substrate. After cell suspension freeze-thawing no formation of HEL FPCs colonies in vitro was established, that testified to a damaging of colony-forming units of fibroblasts (CFU_f) after cryopreservation. Basing on the facts outlined, our further research was oriented to search of damaging cryopreservation factors for early stromal progenitor HEL, CFU_f . Data on successful freezing of mesenchymal SCs, procured from BM of adult

установили, что после криоконсервирования первичной суспензии исследуемых клеток по протоколу, обеспечивающему сохранение гемопоэтических гранулоцитарно-макрофагальных КП ЭПЧ, стромальные предшественники повреждаются [3]. Несмотря на то, что эффективность прикрепления криоконсервированных клеток ЭПЧ не снижалась, были отмечены морфологические изменения клеток после эксплантации в условия монослойного культивирования, которые проявлялись в нарушении процесса распластывания на субстрате. Установлено, что после замораживания-отогрева клеточной суспензии отсутствовало образование колоний ФКП ЭПЧ в условиях *in vitro*, что свидетельствовало о повреждении колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) после криоконсервирования. На основании изложенных фактов наше дальнейшее исследование было направлено на поиск повреждающих факторов криоконсервирования для ранних стромальных предшественников ЭПЧ – КОЕф. Сведения об успешном замораживании мезенхимальных СК, полученных из КМ взрослых пациентов или кордовой крови человека, приведены в работах [4, 7]. При этом в составе криозащитной среды использовали криопротектор ДМСО (5 или 10%) в комбинации с аутологичной сывороткой или ЭС. В связи с этим мы провели серию экспериментов по криоконсервированию первичных суспензий клеток ЭПЧ в среде культивирования, содержащей 20% ЭС и ДМСО (5 и 10%), по вышеуказанным протоколам криоконсервирования.

Во всех выбранных вариантах замораживания жизнеспособность исследуемых клеток после отогрева была достоверно ниже по сравнению со свежевыделенными клетками и клетками после контакта с ДМСО (табл. 1). В вариантах I-IV отмечены морфологические изменения адгезировавших клеток: некоторые приобретали полигональную форму без видимых признаков распластывания на пластике, единичные клетки имели один или два лучеподобных цитоплазматических отростка. При дальнейшем культивировании деконсервированных клеток ЭПЧ в условиях монослоя были выявлены постепенное открепление большого количества адгезировавших клеток, а также измененная морфология с признаками деградации у переживавших клеток в культуре в течение 7-10 суток. Отмечено отсутствие колониеобразования ФКП ЭПЧ после криоконсервирования по указанным вариантам. Изменение условий культивирования для криоконсервированных клеток ЭПЧ (увеличение посевных доз, добавление в состав основной среды кондиционированных сред от соответствующих нативных контролей) не при-

patients or human cord blood are presented in the papers [4, 7]. At the same time as a part of cryoprotective medium we used DMSO cryoprotectant (5 and 10%), combined with autologous serum or ES. In this connection we carried-out some experiments on cryopreserving primary suspensions of HEL cells in cultivation medium, containing 20% ES and DMSO (5 and 10%), according to the mentioned above cryopreservation protocols.

In all selected freezing variants the viability of studied cells after thawing was statistically and significantly lower in comparison with freshly isolated cells and those after contact with DMSO (Table 1). In Ist-IVth variants morphological changes in adhered cells were noted as follows: some of them gained a polygonal shape without visible signs of flattening on plastic, single cells had one or two ray-like cytoplasmic outgrowths. During following cultivation of frozen-thawed HEL cells under monolayer conditions a gradual detachment of great number of adhered cells, as well as a changed morphology with degradation

Таблица 1. Жизнеспособность клеток ЭПЧ до и после криоконсервирования (n=7)
Table 1. HEL cell viability prior to and following cryopreservation (n=7)

Воздействие на клетки ЭПЧ Effect on HEL cells		Жизнеспособность клеток,% Cell viability,%
Без воздействия – свежеизолированные (контроль) No effect – freshly isolated (control)		94,6±0,9
Контакт с криопротектором Contact with cryoprotectant	ДМСО 5% 5% DMSO	93,9±0,8
	ДМСО 10% 10% DMSO	92,2±1,2
Вариант криоконсервирования Cryopreservation variant	I (ДМСО 5%) 1st (5% DMSO)	48,0±2,9*
	I (ДМСО 10%) 1st (10% DMSO)	63,0±4,7*
	II (ДМСО 5%) 2nd (5% DMSO)	54,0±3,3*
	II (ДМСО 10%) 2nd (10% DMSO)	61,8±2,2*
	III (ДМСО 5%) 3rd (5% DMSO)	64,3±3,1*
	III (ДМСО 10%) 3rd (10% DMSO)	58,3±5,1*
	IV (ДМСО 5%) 4th (5% DMSO)	48,2±3,0*
	IV (ДМСО 10%) 4th (10% DMSO)	57,2±2,8*
	V (ДМСО 5%) 5th (5% DMSO)	69,3±5,0*
	V (ДМСО 10%) 5th (10% DMSO)	73,0±3,6*

Примечание: * – различия статистически достоверны (p<0,05) по отношению к контролю.

Note: * - differences are statistically significant (p<0.05) in comparison with the control

водило к улучшению результатов культивирования исследуемых ФКП.

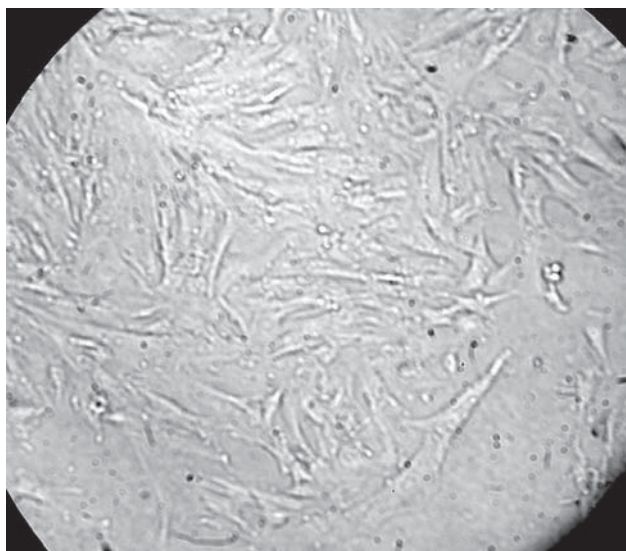
Исключением были клетки, криоконсервированные по варианту V под защитой ДМСО (5 и 10%). В этом случае достигалась сохранность стромальных предшественников, которые после деконсервирования адгезировали к пластику и проявляли морфологические свойства фибробластов. В условиях монослойного культивирования криоконсервированные ФКП ЭПЧ образовывали характерные колонии (рисунок а, б). Хотя и наблюдалось отставание появления признаков колониеобразования (на 3-4 суток) по сравнению с нативным контролем, КОЕф после криоконсервирования активно пролиферировали в течение исследуемого срока наблюдения. Необходимо отметить, что эффективность колониеобразования ФКП, криоконсервированных под защитой 10%-го ДМСО, была достоверно выше по сравнению с аналогичным показателем у проб, криоконсервированных с 5%-м ДМСО (табл. 2). После пассирования первичной культуры (пассаж 1) деконсервированных клеток ЭПЧ количество КОЕф в обеих группах многократно увеличилось.

В литературе сведения о криоконсервировании колониеобразующих ФКП, в число которых входят и мезенхимальные СК, малочисленны. Colter D. S. и соавторы [4] применили медленное замораживание культивированных мезенхимальных СК КМ взрослых людей, которое осуществляли в культуральной среде, содержащей 30% ЭС и 5% ДМСО, с последующим хранением в жидком азоте [4]. Однако авторы не описывают протокол замора-

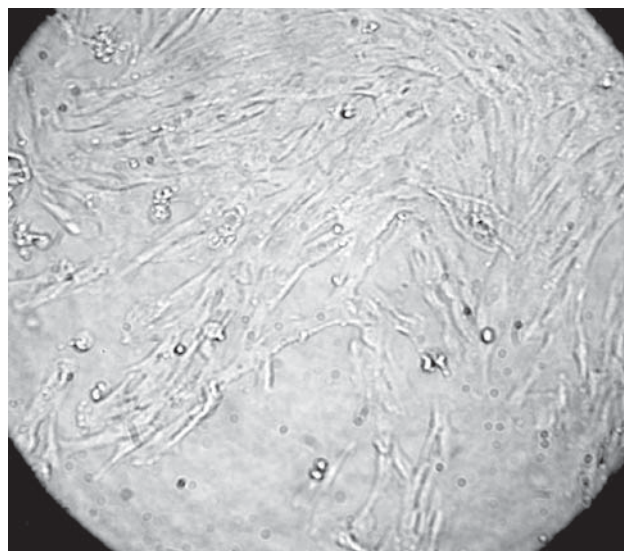
живания, признаки были выявлены в выживших клетках в культуре в течение 7-10 дней. Не отмечено образование колоний ФКП после криоконсервирования по упомянутым вариантам. Изменение условий культивирования для криоконсервированных HEL-клеток (увеличение доз инокуляции, добавление кондиционированной среды из соответствующих нативных контролей в основной состав среды) не привело к улучшению результатов культивирования изучаемых ФКП.

Клетки, криоконсервированные по 5-му варианту под защитой ДМСО (5 и 10%) были исключены. В этом случае была достигнута целостность стромальных прогениторов, которые адгезировали к пластику и проявляли морфологические свойства фибробластов после размораживания. В условиях культивирования в монослое ФКП ЭПЧ образовывали типичные колонии (рис. а, б). Хотя и отмечалось отставание появления признаков колониеобразования (на 3-4 дня) по сравнению с нативным контролем, CFU_f активно пролиферировали после криоконсервирования в течение исследуемого срока наблюдения. Отмечено, что эффективность колониеобразования ФКП, криоконсервированных под защитой 10% ДМСО, была значительно выше по сравнению с аналогичным показателем в образцах, криоконсервированных с 5% ДМСО (Таблица 2). После пассирования замороженных HEL-клеток в первичной культуре (1-й пассаж) количество CFU_f в обеих группах многократно увеличилось.

Данные о криоконсервировании колониеобразующих ФКП, включающих мезенхимальные СК, в литературе немногочисленны. Colter D.C. с соавторами применили медленное замораживание культивированных мезенхимальных СК КМ взрослых людей, которое осуществляли в культуральной среде, содержащей 30% ЭС и 5% ДМСО, с последующим хранением в жидком азоте [4]. Однако авторы не описывают протокол замора-



а



а б

б

Фрагменты колоний ФКП ЭПЧ после криоконсервирования (вариант V) с ДМСО: а – 5%, б – 10%. Культивирование в монослое, 14-е сутки. Прижизненная съемка: об. $\times 10$, ок. $\times 10$.

Fragments of HEL FPCs colonies after cryopreservation (5th variant) with DMSO: а – 5%, б – 10%. Culturing in monolayer, 14th day. Vital microscopy: objective $\times 10$, ocular $\times 10$.

живания, что затрудняет анализ результатов. В работе [7] обсуждается возможность успешного криоконсервирования мезенхимальных СК кордовой крови человека и создания низкотемпературного банка таких клеток для экспериментальных и клинических целей, но не анализируется эффективность примененной техники замораживания. Существует крайне недостаточно литературных данных по изучению влияния факторов криоконсервирования на сохранность и функциональную активность ФКП, в том числе и мезенхимальных СК, выделенных из эмбриональных и фетальных тканей, что обуславливает актуальность таких исследований.

В работе мы сравнивали 5 вариантов замораживания первичной суспензии клеток ЭПЧ: I – успешно применявшийся для криоконсервирования гепатоцитов крыс [8]; II – используемый для криоконсервирования различных типов культивируемых клеток [5]; III-V – варианты медленного программного замораживания. Вариант V принципиально отличается от остальных примененных нами способов замораживания использованием сидинга.

При культивировании клеток ЭПЧ в условиях монослоя выявили необратимые изменения в функциональном статусе адгезировавших клеток после криоконсервирования по вариантам I-IV. Для данных способов замораживания характерен общий недостаток – переохлаждение в замораживаемой суспензии клеток. Необходимо отметить, что у клеток адгезивного пула ЭПЧ, криоконсервированных в указанных условиях, наблюдались сходные морфофункциональные изменения, которые, по-видимому, являются результатом повреждающего действия переохлаждения на цитоскелет и плазматическую мембрану. В вариантах I-IV было обнаружено нарушение адгезивного поведения исследуемых клеток уже в первые часы после эксплантации в культуру. Дегенерация же клеток, изначально проявивших способность к адгезии и переживавших в культуре в течение 7-ми суток, – показатель скрытых необратимых функциональных нарушений состояния клеток ЭПЧ после криоконсервирования.

В условиях замораживания первичных суспензий ЭПЧ по варианту V под защитой ДМСО (5 и 10%) в комбинации с 20%-й ЭС в среде культивирования нами были получены положительные результаты криоконсервирования ФКП ЭПЧ. Исследуемые клетки после отогрева и удаления криопротектора сохраняли способность к образованию колоний в первичной культуре. При использовании данной программы переохлаждение системы не превышало 3°C в отличие от аналогичной программы без сидинга (вариант IV),

Таблица 2. Эффективность колониеобразования ФКП ЭПЧ (n = 5) после криоконсервирования по программе V

Table 2. Efficiency of HEL FPCs colony-formation (n=5) prior to and following cryopreservation by the 5th program

Культура Culture	Эффективность колониеобразования криоконсервированных клеток ЭПЧ $\times 10^{-3}$, % Colony forming activity of HEL frozen-thawed cells $\times 10^{-3}$, %	
	ДМСО 5% 5% DMSO	ДМСО 10% 10% DMSO
Первичная Primary	0,4 \pm 0,1	1,6 \pm 0,7*
Пассаж 1 1st passage	118 \pm 17,0	239,1 \pm 46,0*

Примечание: * – различия между группами клеток статистически достоверны (p<0,05).

Notes: * – differences between groups are statistically significant (p<0.05).

complicates the results analysis. In the paper [7] the possibility of successful cryopreservation of mesenchymal SCs of human cord blood and establishing low temperature bank of these cells for experimental and clinical purposes is discussed, but one does not analyse any application efficiency for freezing technique. The literature data on studying the influence of cryopreservation factors on the integrity and functional activity of FPCs, including mesenchymal SCs, isolated from embryonic and fetal tissues, are highly insufficient, that stipulates such research actuality.

In this work we compared 5 variants of freezing for HEL cells primary suspension: Ist – successfully applied for rat hepatocyte cryopreservation [8]; 2nd – used for cryopreserving cultured cells of different types [5]; 3rd-5th – variants of slow programmable freezing. Application of seeding is the fundamental difference of 5th variant from other freezing ways applied by us.

When culturing HEL cells under monolayer conditions we revealed irreversible changes in functional status of adhered cells after cryopreservation according to the 1st-4th variants. For these freezing ways such a common disadvantage as overcooling in frozen cell suspension is typical. Of note is that in cells of HEL adhesive pool, cryopreserved under mentioned conditions, the similar morpho-functional changes, being apparently the result of damaging effect of overcooling on cytoskeleton and plasmatic membrane, were observed. In the 1st-4th variants a disorder in adhesive behavior of studied cells even in first hours after explantation in culture was revealed. But the degeneration of cells, initially manifested the capability to adhesion and survived in a culture within 7 days, is the sign of hidden irreversible

а также вариантов I и III, в которых переохлаждение достигало $7\pm 1^\circ\text{C}$. При пассировании первичной культуры и последующем культивировании количество КОЕф многократно возрастало, что свидетельствовало о сохранении их способности к самоподдержанию после криоконсервирования. Способность к самоподдержанию, как известно, является важным свойством мультипотентных СК и их ранних недифференцированных потомков.

Выводы

Согласно полученным результатам криоконсервирования ФКП в составе первичных суспензий клеток ЭПЧ можно сделать вывод, что исследуемый тип стромальных КП высокочувствителен к такому повреждающему фактору, как переохлаждение. В случае отсутствия специальных приемов, снижающих степень переохлаждения клеточной суспензии в процессе замораживания, ФКП ЭПЧ претерпевали необратимые структурно-функциональные изменения и, как следствие, были не способны репарироваться в адекватных условиях культивирования *in vitro*. Применение сидинга и уменьшение диапазона переохлаждения до 3°C и менее при использовании трехэтапной программы медленного замораживания с ДМСО позволяет в значительной степени защитить ФКП ЭПЧ, сохранить их пролиферативную активность и клоногенные свойства. Полученные результаты исследования криочувствительности КОЕф ЭПЧ могут быть основой для разработки протокола криоконсервирования мезенхимальных СК различного происхождения.

Авторы статьи выражают благодарность канд. хим. наук Новикову А. Н. за консультативную и техническую помощь в работе по программному замораживанию клеток.

Литература

1. Грищенко В. И., Петренко А. Ю., Волкова Н. А., Скоробогатова Н. Г. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток-предшественников из эмбриональной печени человека в условиях *in vitro* // Доповіді Національної академії наук України.– 2005.– №2.– С. 138-141.
2. Демидова С.А., Левина Д.С., Блюмкин В.Н. и др. Методические указания по работе с клеточными культурами.– Москва: Ин-т вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, 1971.– С.14–15.
3. Скоробогатова Н.Г., Волкова Н.А., Петренко А.Ю. Криочувствительность гемопоэтических и стромальных предшественников в первичной суспензии клеток эмбриональной печени человека // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3. – С. 577–580.
4. *Basic Cell Culture* (The Practical Approach Series)/ Ed. by J.M. Davis.– Oxford University Press, USA, 2002.– 408 p.

functional disorders in HEL cell state after cryopreservation.

Positive results of HEL FPCs cryopreservation were obtained under freezing conditions of HEL primary suspensions by the 5th variant with DMSO protection (5 and 10%) combined with 20% ES in culturing medium. Studied cells preserved the capability for colony formation in primary culture after thawing and cryoprotectant removal. When using this program the system overcooling did not exceed 3°C in contrast to the same program without seeding (4th variant), as well as 1st and 3rd ones, where overcooling approached $7\pm 1^\circ\text{C}$. During primary culture passaging and further cultivation the CFU_f number increased manifold, that testified to preservation of their capability to self-maintaining after cryopreservation. The capability for self-keeping is known to be an important property of multipotent SCs and their early non-differentiated posterity.

Conclusions

According to the data of FPCs cryopreservation as a part of HEL cell primary suspensions we can conclude that the studied type of stromal PCs is highly sensitive to such damaging factor as overcooling. In those cases where a special way for decreasing a degree of cell suspension overcooling is absent, HEL FPCs undergo irreversible structural and functional changes during freezing and, as a result, they are not capable of being repaired under adequate conditions of monolayer culturing. Application of seeding and reducing overcooling range down to 3°C and lower when using the three-step slow freezing program under DMSO protection enable a considerable protection of HEL FPCs, preservation of their proliferative activity and clonogenic properties. The obtained investigation results of HEL CFU_f cryosensitivity can be the base for developing cryopreservation protocol for mesenchymal SCs of different origin.

Authors of the paper are thankful to candidate of chemical sciences Novikov A.N. for advise and technical assistance.

References

1. Grischenko V.I., Petrenko A.Yu., Volkova N.A., Skorobogatova N.G. Colony-forming activity of fibroblast-like progenitor cells from human embryonic liver under in vitro conditions // Doklady NAN Ukrainy.– 2005.– N2.– P. 138-41.
2. Demidova S.A. Levina D.S., Blumkin V.N. et al. Methodical recommendations on working with cell cultures.– Moscow: D.I. Ivanovsky Institute of virology o Acad. Med. Sci. of USSR, 1971.– P.14015.
3. Skorobogatova N.G., Volkova N.A., Petrenko A.Yu. Cryosensitivity of hemopoietic and stromal precursors in primary cell suspension of human embryonic liver // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol.15, N3.– P. 577-580.

5. Colter D.C., Class R., DiGiLamo C.M., Prockop D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic – adherent cells from human bone marrow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2000.– Vol. 97, N7.– P. 3213-3218.
6. Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // Cell Tissue Kinet.– 1970.– Vol. 3, N4.– P. 393-403.
7. Lee M.W., Choi J., Yang M.S. et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2004. – Vol. 320, N1.– P. 273-278.
8. Petrenko A.Yu., Grischuk V.P., Roslyakov A.D. et al. Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethyl sulfoxide and separation in Percoll-density gradient // Cryo-Letters.– 1992.– Vol. 13, N2.– P. 87-98.
9. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell. Biol.– 1976. – Vol.13, N1.– P. 29-83.
10. Zhao J., Hao H. N., Thomas R. L. et al. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells // Stem Cells.– 2001.– Vol.19, N3.– P. 212-218.
4. *Basic Cell Culture* (The Practical Approach Series)/ Ed. by J.M. Davis.– Oxford University Press, USA, 2002.– 408 p.
5. Colter D.C., Class R., DiGiLamo C.M., Prockop D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic – adherent cells from human bone marrow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2000.– Vol. 97, N7.– P. 3213-3218.
6. Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // Cell Tissue Kinet.– 1970.– Vol. 3, N4.– P. 393-403.
7. Lee M.W., Choi J., Yang M.S. et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2004. – Vol.320, N1.– P. 273-278.
8. Petrenko A.Yu., Grischuk V.P., Roslyakov A.D. et al. Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethyl sulfoxide and separation in Percoll-density gradient // Cryo-Letters.– 1992.– Vol. 13, N2.– P. 87-98.
9. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell. Biol.– 1976. – Vol.13, N1.– P. 29-83.
10. Zhao J., Hao H. N., Thomas R. L. et al. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells // Stem Cells.– 2001.– Vol.19, N3.– P. 212-218.

Поступила 21.03.2006

Accepted in 21.03.2006