

# Влияние условий удаления криопротектора ДМСО на жизнеспособность и колониобразующую активность криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека

Н. Г. СКОРОБОГОВА, В. П. ГРИШУК, А. Ю. ПЕТРЕНКО

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

## Influence of Me<sub>2</sub>SO Cryoprotectant Removal Conditions to Viability and Colony Forming Activity of Cryopreserved Cells of Human Fetal Liver

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

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

Изучено влияние различных условий удаления криопротектора ДМСО на жизнеспособность (ЖС) и колониобразующую активность свежeweделенных и криоконсервированных клеток эмбриональной печени (КЭП) человека 7-10 недель гестации. Использование раствора Хенкса как среды отмывания (СО) приводит к снижению общего количества и количества жизнеспособных КЭП. Замена NaCl на сахарозу снижает повреждающее действие процедуры отмывания криопротектора. При этом медленное введение сахарозо-солевого раствора (ССР) позволяет в большей степени сохранить ЖС клеток по сравнению с быстрым способом добавления. Оценку повреждающего действия этапа удаления ДМСО проводили 2 методами окрашивания (трипановым синим и бромистым этидием), учитывая общее количество клеток, ЖС и выход жизнеспособных клеток (ВЖК). Результаты, полученные при различных условиях удаления криопротектора, не зависели от метода оценки и показали, что ВЖК является наиболее чувствительным параметром жизнеспособности криоконсервированных клеток. Колониобразующая активность КЭП человека при культивировании в агаре на фидерном слое, содержащем лейкоциты здоровых взрослых доноров, после криоконсервирования и медленного удаления ДМСО с помощью ССР оставалась на уровне нативного контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ССР меньше повреждает КЭП человека на этапе удаления криопротектора ДМСО.

Вивчено вплив різних умов видалення криопротектора ДМСО на життєздатність і колонієутворюючу активність нативних і криоконсервованих клітин ембріональної печінки (КЕП) людини 7-10 тижнів гестації. Використання розчину Хенкса як середовища відмивання приводить до зниження загальної кількості і кількості життєздатних КЕП. Заміна NaCl на сахарозу знижує негативний вплив процедури видалення криопротектора. При цьому повільне введення сахарозо-солевого розчину (ССР) дозволяє більше зберегти життєздатність клітин у порівнянні зі швидким способом відмивання. Оцінку дії етапу видалення ДМСО проводили 2 методами фарбування (трипановим синім і бромистим етидієм), враховуючи загальну кількість клітин, життєздатність і вихід життєздатних клітин. Результати, отримані при різних умовах видалення криопротектора, не залежали від методу оцінки і показали, що вихід життєздатних клітин є найбільш чутливим параметром життєздатності криоконсервованих клітин. Колонієутворююча активність КЕП людини при культивуванні в агарі на фідері, що містить лейкоцити здорових дорослих донорів, після криоконсервування і повільного видалення ДМСО за допомогою ССР залишалася на рівні нативного контролю. Отримані результати свідчать про те, що ССР найменше ушкоджує КЕП людини на етапі видалення криопротектора ДМСО.

The authors studied the influence of various conditions of Me<sub>2</sub>SO cryoprotectant removal on viability and colony forming activity of freshly isolated and cryopreserved cells of human fetal liver (HFL) of 7-10 gestation weeks. Usage of Hanks solution as a washing-out medium (WM) leads to a decrease in both total number of HFL cells and their viability. Substitution of NaCl with sucrose decreases the damaging effect of cryoprotectant washing-out procedure. In this case a slow introduction of sucrose based saline (SBS) allows to preserve the cells' viability when comparing with rapid washing-out. Estimation of damaging effect of Me<sub>2</sub>SO removal stage was performed by two staining methods (trypan blue and ethidium bromide) with determining the total cell number, viability and cell survival. The results, obtained under various cryoprotectant removal conditions, did not depend on estimation method and showed that cell survival was the most sensible parameter for viability of cryopreserved cells. The value of colony forming activity of HFL cells by culturing in agar on feeder layer with leukocytes of healthy adult donors after cryopreservation and slow removing of Me<sub>2</sub>SO with SBS was at the control level. Obtained results testify to the fact that SBS does less damages to HFL cells at the stage of Me<sub>2</sub>SO cryoprotectant removal.

В настоящее время трансплантация стволовых кроветворных клеток (СКК) получила широкое распространение в лечении различных патологических состояний кроветворной системы. Одним из наиболее ценных источников данных клеток является эмбриональная печень ранних сроков гестации (7-10 недель у человека), когда она

Nowadays the hemopoietic stem cell (HSC) transplantation has become a widely used when treating various pathologies of hemopoietic system. One of the most valuable sources of these cells is fetal liver of early gestation terms (7-10 weeks in human), when it contains immature progenitors of all blood forming differentiation lines, including polypotent HSC,

содержит незрелые предшественники всех кроветворных ростков, включая полипотентные СКК, характеризующиеся высоким дифференцировочным и пролиферативным потенциалами. Технология криоконсервирования КЭП позволяет сохранять клетки в течение продолжительного времени, необходимого для проведения вирусного и бактериального контроля, а также создания низкотемпературного банка. В [2, 19] описаны составы сред и режимы криоконсервирования КЭП человека, но они постоянно совершенствуются. В качестве криопротектора для СКК используется ДМСО [2, 9, 18, 19]. Однако до сих пор вопрос о токсичности ДМСО в концентрациях, обеспечивающих криозащитный эффект, остается открытым и неоднозначным [13]. В частности, сообщалось об осложнениях со стороны сердечно-сосудистой системы реципиентов (снижение артериального давления, брадикардия, аритмия, одышка и др.) [12, 13], описаны единичные случаи развития неврологических реакций [11] в ответ на введение ДМСО, содержавшегося в суспензии стволовых клеток. Ограничить попадание данного соединения в организм реципиентов можно путем отмывания деконсервированных клеток перед трансплантацией. При этом важным условием является не просто максимальное удаление ДМСО из клеточной суспензии, но и сохранение при этом структурной целостности и функциональной активности деконсервированных клеток.

В связи с этим целью настоящей работы было исследование влияния различных условий удаления ДМСО на жизнеспособность КЭП человека на этапе деконсервирования.

Эмбриональную печень человека получали от эмбрионов 7-10 недель гестации после искусственного прерывания беременности и с согласия доноров. Донорский материал транспортировали в стерильных флаконах на льду. Суспензию КЭП получали неферментативным методом [4]. Криоконсервирование клеток проводили под защитой ДМСО в концентрации 5% по разработанной программе [15], отогревали на водяной бане (при 37°C) [19]. В эксперименте исследовали свежeweделенные КЭП после экспозиции с 5%-м раствором ДМСО и деконсервированные. Время контакта свежeweделенных КЭП с 5%-м раствором ДМСО составляло 30 мин [15]. Криопротектор удаляли 2 способами: 1) медленное капельное добавление СО в течение 15 мин при постоянном перемешивании; 2) быстрое добавление СО с последующим выдерживанием 15 мин. После центрифугирования 200 g в течение 5 мин осадок ресуспендировали в 1 мл СО. В качестве СО использовали раствор Хенкса и ССР, разработанный для гипотермического хранения и криокон-

characterised with a high differentiation and proliferation potential. Technology of HFL cells cryopreservation allow long-term cell preserving, essential for performing a viral and bacterial control, and for establishing the low temperature banks. Media composition and cryopreservation regimens for HFL cells are described in the papers [2, 19], but they are constantly improved. Me<sub>2</sub>SO is widely applied as a cryoprotectant for HSC [2, 9, 18, 19]. However the problem of toxicity of Me<sub>2</sub>SO under concentrations, providing the cryoprotective effect, has remained open and complicated [13]. In particular, there are the reports about the complications in cardiovascular system of recipients (arterial pressure decreasing, bradycardia, arrhythmia, dyspnea, etc.) [12, 13], there are some cases of neurological reactions development [11] caused by infusion of Me<sub>2</sub>SO, contained in stem cell suspension. Limitation of entering this substance into recipients' organism is possible by the cryoprotectant washing-out of the thawed cells before transplantation. Not only the maximum removing of Me<sub>2</sub>SO out of cell suspension, but also the preserving of structure integrity and functional activity of thawed cells during this procedure as well.

In this connection the aim of this work was to study the influence of various conditions of Me<sub>2</sub>SO removing to HFL cells' viability at the stage of thawing.

Human fetal liver was obtained from embryos of 7-10 gestation weeks after artificial termination of pregnancy and with the donors' consent. Donor material was transported in sterile flasks on ice. HFL cells suspensions were obtained by non-enzymic method [4]. Cryopreservation of cells was performed under protection of Me<sub>2</sub>SO in 5% concentration by elaborated program [15], suspensions were thawed on water bath (37°C) [19]. In the experiment the freshly isolated HFL cells after exposure with 5% Me<sub>2</sub>SO solution and the thawed ones were investigated. Duration of freshly isolated HFL cells contact with 5% Me<sub>2</sub>SO solution made 30 min [15]. Cryoprotectant was removed by two ways: 1) a slow dropwise adding of WM during 15 min with a constant stirring; 2) rapid adding of WM with following exposure during 15 min. After centrifugation at 200g during 5 min the sediment was resuspended in 1 ml of WM. As WM we used the Hanks solution and SBS, elaborated for a hypothermic storage and cryopreservation of hepatocytes [17]. Thus, the cells of each sample, being in initial cryoprotective medium were divided into three groups: A (control) – without washing-out; B – with the slow adding of WM; C – with the rapid adding of WM. To take into account the casual loss of cells the controls were centrifuged with the following supernatant removal under the same conditions as the experimental samples, but in spite of WM the initial cryopreserving medium was applied. All operations were performed at the temperature of

сервирования гепатоцитов [17].

Таким образом, клетки от каждого образца, находившиеся в исходной криозащитной среде, делили на 3 группы: А (контроль) – без отмывания; В – с медленным добавлением СО; С – с быстрым добавлением СО. Чтобы учесть случайные потери клеток в ходе отмывания, контроли подвергали центрифугированию с последующим удалением супернатанта в тех же условиях, что и опытные пробы, однако вместо СО использовали исходную криозащитную среду. Все операции проводили при температуре 4°C. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. Устойчивость КЭП к криоконсервированию и отмыванию от криопротектора оценивали по окрашиванию трипановым синим [16] и бромистым этидием [8].

Анализ полученных результатов проводили по формулам [7]:

$$СК = (a/\bar{b}) \times 100\%; \text{ ВЖК} = (c/\bar{b}) \times 100\%; \\ \text{ЖС} = (c/a) \times 100\% ,$$

где СК – сохранность клеток; а – общее количество клеток после воздействия;  $\bar{b}$  – общее количество клеток до воздействия; с – количество живых клеток после воздействия.

Колониеобразующую активность *in vitro* определяли при культивировании КЭП в двухслойном агаре по методу [1] в среде DMEM-HAM F12 с 18%-й эмбриональной телячьей сывороткой (в стандартных условиях: в атмосфере воздуха с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C и 100% влажности). Фидерный слой агара содержал лейкоциты, полученные из гепаринизированной крови здоровых взрослых доноров. Подсчет колоний из 40 и более клеток проводили на 10 сутки культивирования.

Статистический анализ результатов проводили непараметрическим методом с помощью критерия Уилкоксона для однородных пар. Результаты представлены как  $M \pm s$ .

Отмывание клеточных суспензий от ДМСО является заключительным этапом процесса криоконсервирования, которому часто не уделяется должного внимания. Удаление данного соединения из клеточных суспензий несет дополнительную осмотическую нагрузку на мембраны деконсервированных клеток. После отогрева клетки уже претерпевают ряд основных негативных влияний, связанных с действием низких температур, и являются довольно уязвимыми, что прежде всего отражается на состоянии их мембран. Поэтому широко используемый в криобиологической практике тест ЖС клеток по окрашиванию трипановым синим был применен и в наших исследованиях. Окрашивание флюоресцентным красителем бромистым этидием также выявляет клетки с поврежденными мембранами. Одновременное использование этих двух тестов

4°C. Cell number was counted in Goryaev's chamber. Resistance of HFL cell to cryopreservation and washing-out of cryoprotectant was assessed by staining with trypan blue [16] and ethidium bromide [8].

Analysis of obtained results was performed with the following formula:

$$\text{Cell recovery} = (a/b) \times 100\%; \text{ Cell survival} = (c/b) \times 100\%; \\ \text{Viability} = (c/a) \times 100\%,$$

where a is the total cell number after effect, b is the total cell number before the effect; c – number of viable cells after effect.

Colony forming activity *in vitro* was assessed by culturing of HFL cells in two-layer agar according to the method in the paper [1] in DMEM-HAM F12 medium with 18% fetal calf serum (under standard conditions: in air atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and 100% humidity). Counting of the colonies, consisted of 40 and more cells was performed by the 10<sup>th</sup> day.

Statistical analysis of results was performed by non-parameter method with Wilcoxon matched pairs test. Results are presented as  $M \pm s$ .

Washing-out of Me<sub>2</sub>SO out of the cell suspensions is a final stage of cryopreservation process, and often no proper attention is paid for it. Removal of this substance from cell suspensions results in an additional osmotic loading to the thawed cells. After warming the cells undergo the series of main negative effects, caused by low temperatures, and remain quite vulnerable, that affects, first of all, their membrane state. That is why we assessed the cells viability with trypan blue staining, which is the most widely used test for cell viability in cryobiological practice. Staining with a fluorescent dye, ethidium bromide also reveals the cells with damaged membranes. Simultaneous usage of these tests allows to increase the authenticity of obtained results and to compare two methods of viability assessment with the same object.

Choosing of the medium and method for removing the cryoprotectant for various types of cells has an important applied aspect and is mostly of empirical character. It is necessary to take into account the following: 1) washing-out medium (WM) should meet the requirements for preparations for intravenous injection; 2) procedure of cryoprotectant removal should take a short time interval (advisably about 30 minutes) after cells' thawing and provide their maximum integrity; 3) washing out procedure should be relatively simple and effective with keeping the sterility of cell suspension. To remove the Me<sub>2</sub>SO out of the suspension of cryopreserved hemopoietic cells, including the fetal ones, one uses usually the balanced salines, in particular the Hanks solutions [2, 10]. In the paper [10] it was shown, that the removing of Me<sub>2</sub>SO with rapid dilution with Hanks solution resulted in a decrease of the number of viable BM hemopoietic



позволяет повысить достоверность полученных результатов и сравнить два метода оценки ЖС на одном и том же объекте.

Выбор среды и способа отмывания от криопротектора для различных типов клеток имеет важный прикладной аспект и обычно носит эмпирический характер. При этом необходимо учитывать: 1) СО должна соответствовать требованиям, предъявляемым к препаратам для внутривенного введения; 2) процедура удаления криопротектора должна занимать небольшой интервал времени (желательно до 30 мин) после размораживания клеток и обеспечивать при этом максимальную их сохранность; 3) процедура отмывания должна быть относительно простой и эффективной при условии сохранения стерильности клеточной суспензии. Для удаления ДМСО из суспензии криоконсервированных кроветворных клеток, в том числе эмбриональных, обычно используют сбалансированные солевые растворы, в частности раствор Хенкса [2, 10]. В работе [10] было показано, что удаление ДМСО при быстром добавлении раствора Хенкса приводило к снижению количества жизнеспособных кроветворных клеток КМ, в то время как при медленном способе отмывания удавалось добиться высокой сохранности данных клеток. Для удаления проникающих криопротекторов, помимо солевых растворов, используют растворы, содержащие моно-, дисахара, например, глюкозу, фруктозу, галактозу, сахарозу и др. Так, в частности, для отмывания клеток эмбрионов мыши от глицерина применялся 0,5 М раствор сахарозы с последующим отмыванием физиологической средой Дюльбекко [6]. На основании изучения изменений объема исследуемых клеток авторами сделан вывод, что основным этапом, ответственным за морфологическую целостность данных клеток, является этап удаления криопротектора. При этом использование гипертонической сахарозы предотвращало чрезмерное набухание клеток. На модели изолированных гепатоцитов нами было показано [3], что удаление ДМСО путем ступенчатого разведения гипертоническими растворами сахарозы успешно заменено медленным капельным внесением изотонического раствора сахарозы. Защитное действие сахарозы может быть связано с ее способностью связывать воду во внеклеточной среде, что обуславливает снижение осмотического градиента на плазматической мембране. В связи с этим для изучения влияния различных условий удаления ДМСО из суспензии криоконсервированных КЭП человека мы использовали раствор Хенкса и ССР.

При отмывании клеток раствором Хенкса (n=6) было обнаружено (по окрашиванию трипановым

cells, meanwhile using the slow dilution a high viability of the cells was managed. To remove the permeable cryoprotectants, in addition to the salines one uses the solutes containing mono- and disaccharides, e.g. glucose, fructose, galactose, sucrose, etc. So, in particular, to wash-out the glycerol out of mouse embryos the sucrose solution was used with following washing out with Dulbecco's physiological medium [6]. Basing on the investigation of volume changes for studied cells the authors concluded, that the main stage, being responsible for morphological integrity of these cells, was the stage of cryoprotectant removal. Here, the usage of hypertonic sucrose solution prevented the over-swelling of cells. We have shown in the model of isolated hepatocytes [3], that Me<sub>2</sub>SO removal by means of step-wise dilution with sucrose hypertonic solutions can be successfully substituted with a slow dropwise introduction of sucrose isotonic solution. Protective effect of sucrose can be related to its ability to bind the water in extracellular medium, that results in a decrease of osmotic gradient on plasma membrane. In this connection we used Hanks solution and SBS to study the effects of various conditions of Me<sub>2</sub>SO removal out of suspension of cryopreserved HFL cells.

When using the Hanks solution as a washing out medium (n=6) there was found (by trypan blue staining) the significant decrease (p<0.05) in all three indices, characterising the viability: cell recovery, cell survival and viability, both in group B and group C, comparing with the corresponding control values (Fig. 1a). When using SBS (n=5) in the group with slow washing out, there was not revealed the significant decrease (p<0.05) of any viability index under study. In the group with rapid washing out we found the cell survival decrease (p<0.05) comparing with the control value (Fig. 1b). There was no significant difference in the results of both supravital staining methods, viability made 63.7±8.5; 58.7±7.7; 56.4±7.2 with trypan blue staining, and 60.6±4.5; 54.6±5.6; 51.0±4.0 with ethidium bromide staining in the groups A, B, and C, correspondingly. Basing on the obtained data the further experiments on Me<sub>2</sub>SO washing-out of HFL cells were conducted using SBS.

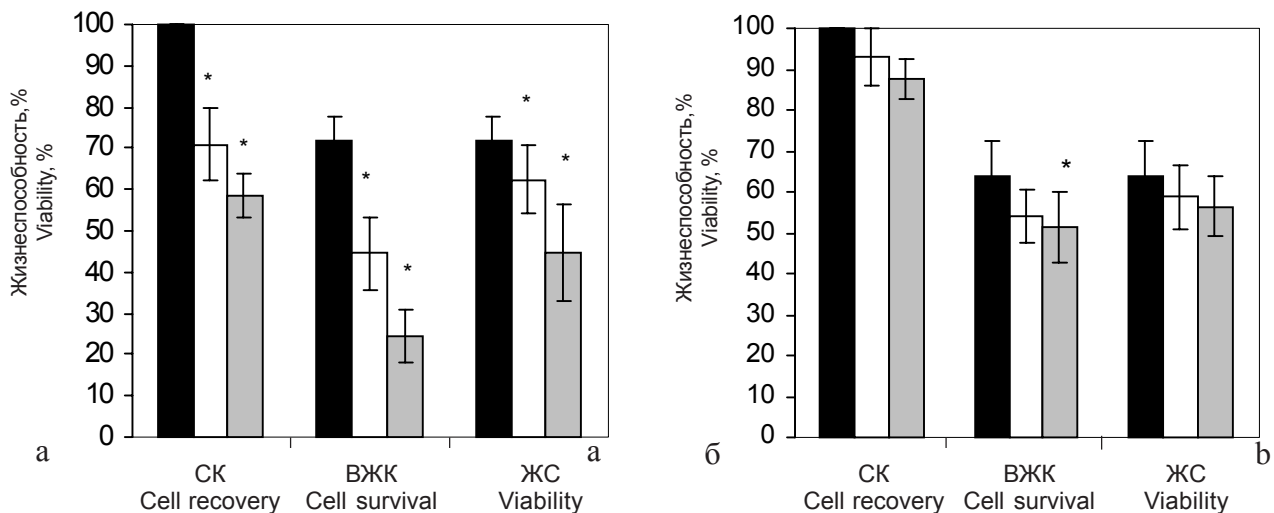
The studied parameters of thawed cells viability reflected the total effect: from one side, it is the influence of contact and removing of cryoprotectant on resistance of plasmatic membranes to dyes; from another side, it is the damage of cells in freeze-thawing cycle. Therefore it was of interest to estimate the difference between the parameters of viability of thawed-washed HFL cells and that of freshly isolated HFL cells, exposed in cryoprotectant solution. To solve the set task we added the 10% solution of Me<sub>2</sub>SO for the final concentration of 5% into suspension of freshly isolated cells (n=5) with viability of 90%. After finishing the exposure time the samples were divided into 3 groups, according to

синим) достоверное снижение ( $p < 0.05$ ) всех трех показателей, характеризующих жизнеспособность СК, ВЖК, ЖС как в группе В, так и в группе С по сравнению с соответствующими контрольными значениями (рис.1,а). При использовании ССР ( $n=5$ ) в группе с медленным отмыванием не было выявлено статистически достоверного снижения ( $p > 0.05$ ) ни одного изучаемого показателя ЖС. В группе с быстрым способом отмывания отмечено снижение ВЖК ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольным значением (рис.1, б). Результаты обоих методов прижизненного окрашивания достоверно не отличались ( $p > 0.05$ ) и составили: по трипановому синему -  $63,7 \pm 8,5$ ;  $58,7 \pm 7,7$ ;  $56,4 \pm 7,2$ , а по окрашиванию бромистым этидием -  $60,6 \pm 4,5$ ;  $54,6 \pm 5,6$  и  $51,0 \pm 4,0$  в группах А, В, С соответственно. На основании полученных данных последующие опыты по отмыванию КЭП от ДМСО проводили с использованием ССР.

Изученные параметры ЖС деконсервированных клеток отражали суммарный эффект воздействий: с одной стороны, это влияние контакта и удаления криопротектора на устойчивость плазматических мембран к красителям, с другой – повреждение клеток в цикле замораживания-отогрева. Поэтому представляло интерес оценить, насколько отличаются показатели ЖС деконсервированных-отмытых КЭП от аналогичных характеристик свежeweделенных КЭП, экспонированных с криопротектором. Для решения поставленной задачи к суспензии свежeweделенных клеток ( $n=5$ ) с ЖС около 90% медленно добавляли 10%-й раствор

the above stated experiment conditions, and then the cryoprotectant was washed-out. Viability parameters, estimated with two methods, in the groups B and C do not significantly differ from the control values ( $p > 0.05$ ) (data are not presented). Thus the procedure of  $Me_2SO$  removal by a slow method of SBS adding does not reduce the number of viable cells in both thawed and freshly isolated HFL cells. However, cell survival after cryopreservation was significantly lower ( $p < 0.05$ ), comparing with the corresponding values of this parameter for freshly isolated HFL cells, exposed with  $Me_2SO$ , both in the groups with washing-out and in the control (Fig. 2).

Methods of supravital staining allows to estimate the state of cell plasmatic membrane, but not their function. A specific integral index for functional activity of hemopoietic progenitor cells is their colony forming activity *in vitro*. In this connection we have studied the colony forming activity of freshly isolated HFL cells, and cryopreserved ones before and after  $Me_2SO$  removal. Washing out was performed by means of slow adding of SBS under the proportions described above. Culturing results are presented in Fig. 3. Total number of colony forming units (CFU) per  $10^5$  seeded nucleated cells made  $231 \pm 27$  in freshly isolated HFL cells,  $315 \pm 93$  in cryopreserved cells before washing out of cryoprotectant, and  $275 \pm 45$  in cryopreserved and washed cells. There was no significant difference between studied cell groups ( $p > 0.05$ ). Obtained results testify to the fact that colony forming activity of thawed HFL cells does not significantly decrease after cryoprotectant removal out of suspension using SBS



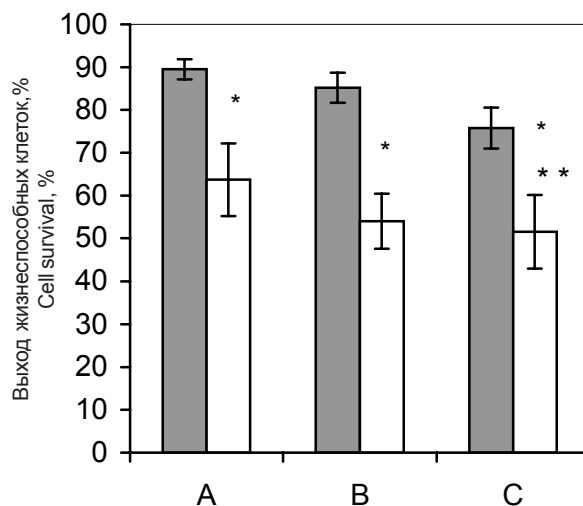
**Рис.1.** Влияние процедуры удаления ДМСО с помощью раствора Хенкса (а) и ССР (б) из суспензии деконсервированных КЭП человека на СК, ВЖК, ЖС: ■ – клетки без отмывания от ДМСО (контроль); □ – клетки с медленным капельным способом добавления СО; ▒ – клетки с быстрым способом добавления СО; \* – различия статистически достоверны по сравнению с соответствующими контролями,  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Effect of  $Me_2SO$  removal using Hanks solution (a) and SBS (b) from suspension of thawed HEL cells on cell recovery, survival, and viability: ■ – cells without  $Me_2SO$  removal (control); □ – cells with the slow dropwise adding of washing medium; ▒ – cells with the rapid addition of washing medium; \* – differences are significant comparing with the corresponding controls,  $p < 0.05$ .

ДМСО до конечной концентрации 5%. По окончании времени экспозиции образцы делили на 3 группы согласно вышеописанным условиям эксперимента, затем удаляли криопротектор. Параметры ЖС, оцененные по 2 методам, в опытных группах В и С достоверно не отличались от соответствующих контрольных значений ( $p > 0,05$ ) (данные не приведены). Таким образом, процедура удаления ДМСО при медленном способе добавления ССР не снижала количество жизнеспособных клеток как в группе деконсервированных, так и свежeweделенных КЭП. Однако ВЖК после криоконсервирования был достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) по сравнению с соответствующими значениями данного параметра свежeweделенных КЭП, экспонированных с ДМСО как в группах с отмыванием, так и в контроле (рис. 2).

Методы прижизненного окрашивания позволяют оценить состояние плазматической мембраны клеток, но не их функцию. Специфическим интегральным показателем функциональной активности гемопоэтических клеток-предшественников является колониеобразование *in vitro*. В связи с этим в данной работе исследовали колониеобразующую активность свежeweделенных КЭП, а также криоконсервированных до и после удаления ДМСО. Отмывание проводили путем медленного добавления ССР в соотношениях, описанных выше. Результаты культивирования представлены на рис. 3. Суммарное количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на  $10^5$  посаженных ядродержащих клеток составило:  $231 \pm 27$  – у свежeweделенных КЭП,  $315 \pm 93$  – у криоконсервированных клеток до отмывания от криопротектора и  $275 \pm 45$  – у криоконсервированных – отмываемых клеток. Достоверных различий между исследуемыми группами клеток выявлено не было ( $p > 0,05$ ). Полученные результаты свидетельствуют о том, что колониеобразующая активность деконсервированных КЭП достоверно не снижалась после удаления криопротектора из суспензии с помощью ССР по сравнению с контролем и с клетками без отмывания от ДМСО.

Сравнительный анализ параметров ЖС свежeweделенных КЭП, экспонированных с криопротектором и криоконсервированных КЭП до и после отмывания позволил определить, на каком этапе происходит основное повреждение клеток и роль самого процесса удаления ДМСО в сохранности КЭП. Хотя в ходе процесса криоконсервирования отсутствует процедура отмывания свежeweделенных клеток, экспонированных с криопротектором, этот этап был выполнен нами отдельно для выяснения роли контакта КЭП с ДМСО до начала замораживания. Такой подход не выявил повреждающего действия используемой концентрации



**Рис. 2.** Выход жизнеспособных клеток свежeweделенных после экспозиции и удаления ДМСО (1) и деконсервированных КЭП (2): А – клетки без отмывания от ДМСО (контроль); В – клетки с медленным капельным способом добавления ССР; С – клетки с быстрым способом добавления ССР; \* – различия статистически достоверны по сравнению с соответствующими значениями ВЖК свежeweделенных КЭП, экспонированных с ДМСО,  $p < 0,05$ ; \*\* – различие статистически достоверно по сравнению с контролем.

**Fig. 2.** Cell survival: freshly isolated HEL cells after exposure (1) and thawed HEL cells (2): А – cells without Me<sub>2</sub>SO removal (control); В – cells with the slow dropwise adding of washing medium; С – cells with the rapid adding of washing medium; \* – differences are significant comparing with the corresponding values of YVC of freshly isolated HEL cells, exposed with Me<sub>2</sub>SO,  $p < 0,05$ ; \*\* – difference is significant comparing with the control,  $p < 0,05$ .

comparing with the control and the cells without Me<sub>2</sub>SO removing.

Comparative analysis of viability parameters of freshly isolated HFL cells, exposed with the cryoprotectant, and cryopreserved cells before and after cryoprotectant removal allowed to determine the stage, at which the main damaging of cells occurs, and the role of Me<sub>2</sub>SO removal process in HFL cells viability. Although in cryopreservation process there is no washing-out procedure of freshly isolated cells, exposed with cryoprotectant, we have performed this for revealing the role of HFL cells contact with Me<sub>2</sub>SO before the freezing. Such approach does not reveal the damaging effect of the used Me<sub>2</sub>SO concentration in studied time span. In this case the results do not depend on the estimation method and showed that the cell survival was the most sensible parameter of cryopreserved cells viability. Using cell survival parameter the damage of cryopreserved HFL cells during rapid adding of SBS was revealed, meanwhile other parameters (cell recovery and viability) did not significantly change. This conclusion conforms to the statement of D. Pegg, saying that when studying various cryobiological tasks the ratio between viable cells after effect to the total cell number before the effect is of

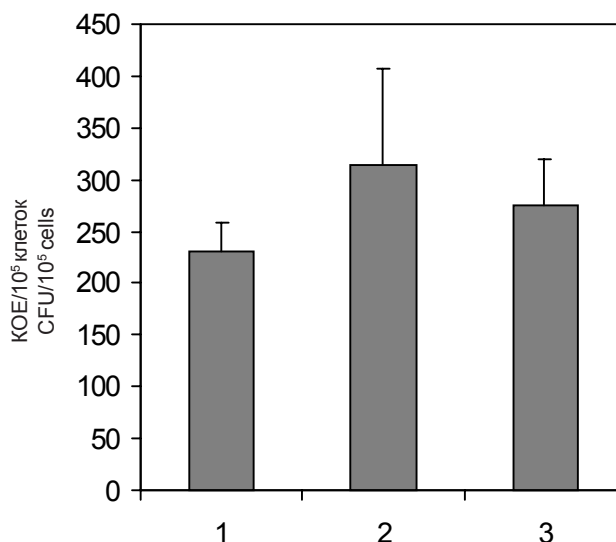
ДМСО в исследуемый интервал времени. При этом результаты не зависели от метода оценки и показали, что выход жизнеспособных клеток является наиболее чувствительным параметром ЖС криоконсервированных клеток. С помощью ВЖК было выявлено повреждение криоконсервированных КЭП при быстром способе добавления ССР, в то время как другие параметры (СК и ЖС) достоверно не изменялись. Данный вывод согласуется с мнением D. Pegg, что при решении различных криобиологических задач особое значение имеет отношение количества жизнеспособных клеток после воздействия к общему количеству клеток до воздействия, поскольку только в этом случае учитывается потеря клеток, утративших целостность в результате воздействия [14]. В данной работе установлено достоверное снижение ВЖК КЭП непосредственно после отогрева (до начала отмывания деконсервированных клеток). Полученные результаты свидетельствуют о том, что гибель клеток происходит, в основном, на низкотемпературных стадиях процесса консервирования и при отогреве.

Функциональные исследования *in vitro* показали, что колониеобразующая активность криоконсервированных КЭП человека не снижалась и оставалась на уровне нативного контроля как у образцов без отмывания от ДМСО, так и при медленном способе отмывания ССР. Сравнительный анализ данных ЖС и результатов культивирования КЭП показывает, что на фоне снижения выхода жизнеспособных клеток после замораживания-отогрева общее количество КОЕ не изменяется. Одним из объяснений этого факта может быть устойчивость к факторам криоконсервирования, включающим процедуру удаления криопротектора, ранних клеток-предшественников эмбриональной печени человека, способных образовывать колонии в условиях культивирования. Потеря жизнеспособных клеток, по видимому, происходит за счет клеток, не входящих в число КОЕ. Это, в частности, могут быть более зрелые гемопоэтические клетки, а также клетки негемопоэтического ряда.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что ССР при медленном способе его добавления в наименьшей степени повреждает КЭП человека на этапе удаления ДМСО.

### Литература

1. Гольдберг Е. Д. Методы культуры ткани в гематологии.— Томск: Изд-во ТГУ, 1992.— 272 с.
2. Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование).— Киев: Наук. думка, 1988.— 192 с.



**Рис.3.** Колониеобразующая активность свежeweделенных (1), криоконсервированных КЭП человека до (2) и после (3) отмывания от ДМСО.

**Fig. 3.** Colony forming activity of freshly isolated (1), and cryopreserved HEL cells before (2) and after (3) Me<sub>2</sub>SO removal.

special importance, because just in this case it is possible to take into account the loss of cells, lost their integrity after the effect [14]. We have found the significant decrease in cell survival of HFL cells immediately after warming (before the washing-out thawed cells). These results testify to the fact, that cell death occurred mainly at the low temperature stages of preservation.

*In vitro* functional investigations showed that colony forming activity does not decrease, and remains on the value of native control both in the samples without Me<sub>2</sub>SO removing, and in that washed out by slow SBS dilution. Comparative analysis of data on viability and results of HFL cells culturing showed, that on the background of decrease in cell survival after freeze-thawing no changes in total number of CFU is observed. One of the explanations of this fact might be the resistance of early progenitor cells of HFL, being capable to form the colonies under these culturing conditions, to the factors of cryopreservation, including the procedure of cryoprotectant removal. The loss of viable cells, probably, occurs due the cells, being beyond the CFU number. In particular, these can be more mature hemopoietic cells, and the cells of non-hemopoietic row.

Thus, the obtained results testify to less damaging effect of SBS to the HFL cells at the stage of the Me<sub>2</sub>SO removal, when using its slow adding.

### References

1. Goldberg E. D. Methods of tissue culturing in hematology.— Tomsk: Tomsk State University Publishing house, 1992.— 272 p.



3. *Петренко А. Ю., Грищук В. П.* Влияние замораживания отогрева под защитой диметилсульфоксида на сохранность изолированных гепатоцитов крыс // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов.– Харьков, 1990.– С. 109-114.
4. *Петренко А. Ю., Сукач А. Н., Росляков А. Д., Мазур С. П.* Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия.– 1991.– 56, № 9.– С. 1647-1651.
5. *Пушкар Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М. и др.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
6. *Смолянинова Е. И., Хроменкова О. Б., Жерноклев Г. В.* Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши // Пробл. криобиологии.– 2001.– №2.– С. 49-55.
7. *Armitage W. J., Mazur P.* Osmotic tolerance of human granulocytes // Am. J. Physiol.– 1984.– Vol. 247.– P. 373-381.
8. *Dankberg F., Persidsky M. D.* A test of granulocyte integrity and phagocytic function // Cryobiology.– 1976.– Vol. 13.– P. 430-432.
9. *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.
10. *Grander M., Berthier R., Hollard D.* Frozen human bone marrow from normal individuals: a possible controle for the culture of human bone marrow in agar // Exp. Hemat.– 1977.– Vol. 5, №6.– P. 436-442.
11. *Hoyt R., Szer J., Grigg A.* Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells // Bone Marrow Transplant.– 2000.– Vol. 25, N12.– P. 1285-1287.
12. *Keung Y. K., Lau S., Elkayam U. et al.* Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells // Bone Marrow Transplant.– 1994.– Vol. 14, N3.– P. 363-367.
13. *Martino M., Morabito F., Messina G. et al.* Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complication in graft recipients // Haematologica.– 1996.– Vol. 81, N1.– P. 59-61.
14. *Pegg D.* Viability assays for preserved cells, tissues and organs // Cryobiology.– 1989.– Vol. 26.– P. 212-231.
15. *Petrenko A. Yu., Grischuk V. P., Roslyakov A. D., Masur S. P., Belous A. M.* 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.– P. 87-98.
16. *Seglen P. O.* Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell. Biol.– 1976.– Vol. 13.– P. 29-83.
17. *Shanina I., Kravchenko I., Fuller B., Grischenko V.* A comparison of a sucrose-based solution with others preservation media for cold storage of isolated hepatocytes // Cryobiology.– 2000.– 41.– P. 315-318.
18. *Yang H., Acker J. P., Hannon J. et al.* Damage and protection of UC blood cells during cryopreservation // Cytotherapy.– 2001.– Vol. 3, N5.– P. 377-386.
19. *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.
2. *Grischenko V.I., Lobyntseva G.S., Votyakova I.A., Shereshkov S.I.* Hemopoietic cells of human embryonic liver (embryogenesis, transplantation and cryopreservation).– Kiev: Nauk. Dumka, 1988.– 192 p.
3. *Petrenko A. Yu., Grischuk V.P.* Influence of freeze-thawing under dimethyl sulfoxide protection on the viability of rat isolated hepatocytes // Physical and chemical properties and biological action of cryoprotectants.– Kharkov, 1990.– P. 109-114.
4. *Petrenko A. Yu., Sukach A.N., Roslyakov A.D., Mazur S.P.* Isolation of rat hepatocytes by a non-enzymatic method: detoxication and breathing activity // Biokhimiya.– 1991.– Vol. 56, N9.– P. 1647-1651.
5. *Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., et al.* Cryoprotectants.– Kiev: Nauk. Dumka, 1978.– 204 p.
6. *Smolyaninova E.I., Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V.* Influence of various steps of cryopreservation by a method of ultra-rapid freezing on osmotic resistance and morphofunctional integrity of mouse embryos // Problems of Cryobiology.– 2001.– N2.– P. 49-55.
7. *Armitage W. J., Mazur P.* Osmotic tolerance of human granulocytes // Am. J. Physiol.– 1984.– Vol. 247.– P. 373-381.
8. *Dankberg F., Persidsky M. D.* A test of granulocyte integrity and phagocytic function // Cryobiology.– 1976.– Vol. 13.– P. 430-432.
9. *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.
10. *Grander M., Berthier R., Hollard D.* Frozen human bone marrow from normal individuals: a possible controle for the culture of human bone marrow in agar // Exp. Hemat.– 1977.– Vol. 5, №6.– P. 436-442.
11. *Hoyt R., Szer J., Grigg A.* Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells // Bone Marrow Transplant.– 2000.– Vol. 25, N12.– P. 1285-1287.
12. *Keung Y. K., Lau S., Elkayam U. et al.* Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells // Bone Marrow Transplant.– 1994.– Vol. 14, N3.– P. 363-367.
13. *Martino M., Morabito F., Messina G. et al.* Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complication in graft recipients // Haematologica.– 1996.– Vol. 81, N1.– P. 59-61.
14. *Pegg D.* Viability assays for preserved cells, tissues and organs // Cryobiology.– 1989.– Vol. 26.– P. 212-231.
15. *Petrenko A. Yu., Grischuk V. P., Roslyakov A. D., Masur S. P., Belous A. M.* 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.– P. 87-98.
16. *Seglen P. O.* Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell. Biol.– 1976.– Vol. 13.– P. 29-83.
17. *Shanina I., Kravchenko I., Fuller B., Grischenko V.* A comparison of a sucrose-based solution with others preservation media for cold storage of isolated hepatocytes // Cryobiology.– 2000.– 41.– P. 315-318.
18. *Yang H., Acker J. P., Hannon J. et al.* Damage and protection of UC blood cells during cryopreservation // Cytotherapy.– 2001.– Vol. 3, N5.– P. 377-386.
19. *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 16.07.2002

Accepted in 16.07.2002