

Изменение функционального состояния кроветворных клеток фетальной печени в зависимости от режимов криоконсервирования

Е.Е. ЯМПОЛЬСКАЯ, Т.Г. ДУБРАВА, Т.М. ГУРИНА, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Change of Functional State of Fetal Liver Hematopoietic Cells Depending on Cryopreservation Protocol

E. YE. YAMPOLSKAYA, T. G. DUBRAVA, T. M. GURINA, A. N. GOLTSEV

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

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – прототип модели определения общего биологического потенциала стволовых клеток млекопитающих. В связи с их востребованностью необходима разработка эффективных методов криоконсервирования и долгосрочного хранения как обязательных компонентов технологического процесса при использовании в клинической практике.

Цель работы – исследование влияния различных режимов криоконсервирования на структурно-функциональные параметры стволовых кроветворных клеток фетальной печени (КФП) в системе *in vitro*.

Эксперименты проводились на мышах линии СВА 12-14-недельного возраста массой 18-20 г. Манипуляции с животными выполнены согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985). КФП со сроком гестации 13-15 суток были получены на среде 199 с 3% эмбриональной телячьей сыворотки и 2% цитрата натрия.

Криоконсервирование КФП осуществляли под защитой 5 или 7,5% диметилсульфоксида (ДМСО) на программном замораживателе “Cryoson” (Германия) со скоростью 1°C/мин до –40°C (режим Крио-1) и 1°C/мин до –40°C с 10-минутной экспозицией на плато кристаллизации, а также со скоростью 10°C/мин от –40 до –80°C (режим Крио-2) с последующим погружением образцов в обоих случаях в азот.

Содержание колониеобразующих единиц грануломоноцитопоеза (КОЕ-ГМ) в КФП определяли в системе *in vitro* по количеству формирующихся в агаровой культуре колоний (КОЕ) и кластеров (КлОЕ). Их идентификацию в нативном материале осуществляли на 7-е сутки, в криоконсервированном – на 14-е сутки культивирования. Для оценки особенностей распределения кроветворных клеток различной степени дифференцировки был введен индекс пролиферативной активности (ИПА – КОЕ/КлОЕ).

Установлено, что максимальную сохранность КОЕ-ГМ КФП обеспечивал режим Крио-2 (5% ДМСО). При режиме Крио-1 с обеими концентрациями ДМСО в условиях сниженного количества КОЕ-ГМ сохранялся сбалансированный состав их субпопуляций (КОЕ и КлОЕ), соответствующий таковому в интактных КФП. Перераспределение субпопуляционного состава среди КОЕ-ГМ является основанием для использования различных режимов криоконсервирования как фактора дифференциального воздействия на определенные компартменты кроветворных предшественников фетальной печени.

Hematopoietic stem cells (HSCs) are prototypes of the model of determination of general biological potential of mammalian stem cells. Due to their being in demand there is a need in development of effective methods of cryopreservation and long-term storage as mandatory components of technological process when using them in clinical practice.

The research purpose is to study the influence of different cryopreservation regimens on structural and functional parameters of fetal liver hematopoietic stem cells *in vitro*.

The experiments were done in CBA mice of 12-14 weeks' age and 18-20 g weight. In accordance with “European convention of protection vertebrate animals used for experimental and other experimental purposes” (Strasbourg, 1985). Fetal liver cells (FLCs) with the gestation term of 13-15 days were obtained with medium 199 and embryonic calf serum 3 % and sodium citrate 2%.

FLC cryopreservation was realized under protection of either 5 or 7.5 % DMSO with programmable freezer “Cryoson” (Germany) with the rate 0°C/min down to –40°C (regimen Cryo-1) and 1C/min down to –40°C with 10 min's exposure on crystallization plateau, as well as with the rate of 10°C/min from –40°C down to –80°C (regimen Cryo-2) with following plunging of the samples into nitrogen in both cases.

The content of colony-forming units of granulomonocytopenesis (CFU-GM) in FLCs was found *in vitro* on the number of colonies in agar culture (CFU) and clusters (CIFU) being formed. Their identification in native material was performed to the 7-th day, in and to the 14-th day of culturing in cryopreserved one. To estimate the peculiarities of distribution of hematopoietic cells with different differentiation extent proliferative activity index was defined (PAI) (CFU/CIUE).

There was found, that regimen Cryo-2 (5% DMSO) provided the highest survival of CFU-GM. When using regimen Cryo-1 with both DMSO concentrations at decreased amount of CFU-GM the balanced composition of their subpopulations (CFU-CIUE) preserved. This composition corresponded to the one for intact FLCs. Redistribution of subpopulation CFU-GM composition is the reason of using different cryopreservation regimens as the factor of differential influence on certain compartments of hematopoietic precursors of fetal liver.