

Кинетика осмотических реакций ядросодержащих клеток костного мозга мышы и кордовой крови человека на этапе удаления из них проникающего криопротектора

В.С. ХОЛОДНЫЙ, Л.Ф. РОЗАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Kinetics of Osmotic Responses of Nucleated Cells of Mice Bone Marrow and Human Cord Blood at the Stage of Penetrating Cryoprotectant Removal

KHOLODNYI V.S., ROZANOV L.F.

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

Изучали поведение ядросодержащих клеток костного мозга мышы и кордовой крови человека при их перенесении из растворов ДМСО, 1,2 пропандиола (ПД) и глицерина. С использованием модифицированной модели Кедем-Качальского определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток на этапе удаления из них проникающего криопротектора.

Вивчали поведінку ядровмісних клітин кісткового мозку миші і кордової крові людини при їх перенесенні з розчинів ДМСО, 1,2 пропандіолу і гліцерину. З використанням модифікованої моделі Кедем-Качальського визначено коефіцієнти проникності плазматичних мембран клітин на етапі вилучення з них проникного криопротектора.

The behaviour of nucleated cells of mice bone marrow and human cord blood during their transfer out of DMSO, 1,2-propane diol (PD) and glycerol solutions has been studied. Using modified model of Kedem-Katchalsky the penetration coefficients of plasmatic membranes of cells at the stage of cryoprotectant removal out of them were determined.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников используется для лечения заболеваний различного происхождения [5, 6, 11]. Источниками этих клеток являются костный мозг, периферическая кровь и плацентарная/пуповинная кордовая кровь. В настоящее время основной метод создания долговременных запасов этого трансплантационного материала – низкотемпературное хранение – сложный процесс, включающий множество этапов. Одним из этапов, определяющих сохранность клеток, а значит и качество трансплантируемого материала, является удаление криопротектора из клеток после их размораживания. Изучение осмотических процессов, происходящих на этом этапе, позволит лучше понять причины повреждений клеток и найти возможные пути повышения их сохранности. Нами были изучены осмотические реакции клеток костного мозга мышы и кордовой крови человека при удалении из них проникающих криопротекторов ДМСО, 1,2 ПД и глицерина. В результате анализа осмотических процессов, протекающих на этапе добавления к клеткам криозащитных сред [3, 4], были определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран ядросодержащих клеток костного мозга мышы и кордовой крови человека для воды и указанных криопротекторов. В связи с этим интересно было сравнить транспортные характеристики клеточных мембран при разнонаправленных потоках воды и криопротекторов.

Transplantation of hemopoietic stem and progenitor cells is used to treat diseases of various origin [5,6,11]. The sources of these cells are bone, marrow, peripheric blood and placenta/umbilical cord blood. Nowadays the main method of creating the long-term stocks of this transplantation material is low temperature storage, a complicated process, comprising many stages. One of the stages, determining the cell integrity and consequently the quality of the material being transplanted, is the removal of cryoprotectant out of cells after their thawing. The studying of osmotic processes, occurring at this stage, will allow the better understanding of the causes and searching for feasible ways of an enhancing their integrity. We have studied the osmotic reactions of the cells of mice bone marrow and human cord blood when removing the penetrating cryoprotectants of DMSO, 1,2-PD and glycerol out of them. In the result of the analysis of osmotic processes, proceeding at the stage of adding of cryoprotective media to cells [3,4] the permeability coefficients for plasmatic membranes of nucleated cells of mice bone marrow and human cord blood for water and the mentioned cryoprotectants have been determined. In this connection it would be interesting to compare transport characteristics of cellular membrane for in- and oufluxes of water and cryoprotectants.

To obtain bone marrow cells the femour bones of (CBAxС57Bl) F1 mice aged 8-12 weeks were

Для получения клеток костного мозга бедренные кости мышей линии (СВА×С57В1) F1 возрастом 8-12 недель промывали. После ресуспендирования их выдерживали 5 мин для осаждения конгломератов и затем использовали в эксперименте.

Ядродержащие клетки кордовой крови, полученной на глюкоцитратном буфере, выделяли методом ускоренного осаждения эритроцитов в коллоидных растворах низкой плотности [2, 9]. С этой целью мы использовали 1%-й раствор желатина, содержащего сахарозу, глюкозу, цитрат натрия и ЭДТА натрия. Кровь смешивали с раствором в соотношении 1:2 и оставляли на 60 мин при 23°C до разделения на эритроцитарную массу и надосадов с ядродержащими клетками. Надосадов снимали и центрифугировали. После отмывания глюкозо-цитратным раствором суспензию клеток ресуспендировали и сразу же использовали в эксперименте.

Для изучения осмотической реакции клеток на этапе отмывания от проникающих криопротекторов клеточные суспензии предварительно выдерживали в растворах 1М ДМСО и 1М 1,2-ПД в течение 10 мин при 18°C и 1М глицерина в течение 20 мин при той же температуре. Временные промежутки были выбраны исходя из оценки времени, необходимого для насыщения клеток криопротекторами [3, 4].

Исследования проводили на интерференционно-поляризационном микроскопе МПИ-5, входящем в состав микрокиноустановки МКУ-3, позволяющей регистрировать процессы, которые протекают в изучаемом образце. С помощью этой установки мы оценивали осмотический ответ клеток костного мозга при различных условиях удаления криопротекторов. В качестве отмывочных растворов использовали физиологический раствор (0,15 М NaCl), раствор, содержащий 0,5 М криопротектора и 0,15 М NaCl (для моделирования двухэтапной отмывки), а также 0,5М раствор NaCl. Анализируя микроскопические изображения, оценивали осмотическую реакцию клеток.

Параметры проницаемости определяли путем анализа данных изменения клеточного объема во времени с помощью уравнений Kedem-Katchalsky [7], модифицированных для условий эксперимента [1, 4]. Эти уравнения были решены методом Рунге-Кутты с использованием компьютерной программы, разработанной в отделе низкотемпературного консервирования ИПКиК НАН Украины. Значение осмотически неактивного объема клетки α [4], определенное с помощью уравнения Boyle van't Hoff использовалось при подгоночных расчетах. Значение коэффициента отражения σ в расчетах было принято равным 0.95 [1].

Зависимости, полученные в результате анализа изображений клеток, подвергнутых переносу в среду с меньшей тоничностью, приведены на

washed. After re-suspending they were kept during 5 min to precipitate the conglomerates and then were used in the experiment.

Nucleated cells of cord blood, obtained with glucose-citrate buffer, were isolated by the method of accelerated sedimentation of erythrocytes in colloid solutions of low density [2,9]. With this aim we used 1% gelatine solution, containing sucrose, glucose, sodium citrate and sodium EDTA. Blood was mixed with the solution in the 1:2 ratio and left for 60 min at 23°C up to the division to erythrocyte and supernatant with nucleated cells. Supernatant was taken off and centrifuged. After washing-out with glucose-citrate solution the suspension of cells was re-suspended and just at once was used in the experiment.

To investigate the osmotic response of cells at the stage of penetrating cryoprotectants' washing-out the cellular suspensions were preliminarily kept in the solutions of 1 M DMSO and 1 M 1,2-PD within 10 min at 18°C and 1 M glycerol within 20 min at the same temperature. Time intervals were chosen taking into account the estimation of the time, necessary for saturation of cells with cryoprotectants [3,4].

Investigations were performed with interference-polarisation microscope MPI-5 together with microfilm camera MKU-3, allowing to recorder the processes, proceeding in the sample under study. Using them we evaluated the osmotic response of bone marrow cells under various conditions of cryoprotectant removal. As washing-out solutions we used physiological solution (0.15 M NaCl), the one, containing 0.5 M cryoprotectant and 0.15 M NaCl (for modelling the two-stage washing-out), as well as 0.5 M NaCl solution. Analysing microscopic images we have estimated an osmotic response of the cells.

The parameters of permeability were determined by means of the analysis of data of the changes in cellular volume with the time using the Kedem-Katchalsky formalism [7], modified for the experiment conditions [1,4]. These equations were solved by the method of Runge-Kutta with the software, designed at the department of low temperature preservation of the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. The value of osmotically inactive cell volume, α [4], determined with the Boyle van't Hoff equation, was used in fitting calculations. Reflection coefficient value σ in calculations was assumed to be 0.95 [1].

The dependencies, obtained in the result of analysis of the images of cells, subjected to the transfer into the medium with lower tonicity, are presented in Fig. 1. It is seen, that when transferring the cells out of 1 M cryoprotectant solution into physiological solution (open circles in Fig. 1) the

рис. 1. Видно, что при переносе клеток из 1М раствора криопротектора в физический раствор (данные показаны незаштрихованными окружностями на рис. 1) изучаемые клетки увеличиваются в объеме до 190% от первоначального и затем постепенно возвращаются к исходному объему. Следует отметить, что в таких условиях большое количество клеток претерпевало различные повреждения и в исследовании реакции использовали только клетки, в которых видимых морфологических изменений не было. Скорость восстановления объема различна для разных криопротекторов – быстрее всего объем восстанавливают клетки, экспонированные в растворе 1,2 ПД, затем ДМСО и глицерина. Существует разница и между скоростью восстановления объема клеток костного мозга и cordовой крови: клетки cordовой крови восстанавливают свой объем несколько быстрее. При переносе клеток из 1М раствора криопротектора в 0,5М раствор того же криопротектора (данные показаны заштрихованными окружностями на рис. 1) увеличение объема значительно меньше, чем при переносе их в физиологический раствор, и не превышает 120% от первоначального. Такое различие в изменении

cells under study increase the volume up to 190% of primary one and then gradually return to an initial volume. It should be noted that under such conditions a big number of cells was undergone with various damages and when studying the osmotic response we used only the cells with no visible morphological changes. The rate of the volume recovery was different for various cryoprotectants: more rapidly the volume recovered for the cells, exposed in 1,2-PD solution, then DMSO and glycerol. There is a difference between the rate of volume recovery of bone marrow cells and cord blood ones: the cells of cord blood recover their volume more rapidly. When transferring the cells out of 1 M of cryoprotectant solution into 0.5 M solution of the same cryoprotectant (Fig. 1, closed circles) the increase in the volume is significantly less, than under their transfer to physiological solution and does not exceed 120% of initial one. Such a difference in the volume change can explain why under two-stage washing-out (1→0.5→0M of cryoprotectant) the cell integrity is considerably higher that during single-stage [10]. Plasmatic membrane can be damaged during the transfer into the medium with significantly lower tonicity in the result of its extra-stretching. Under

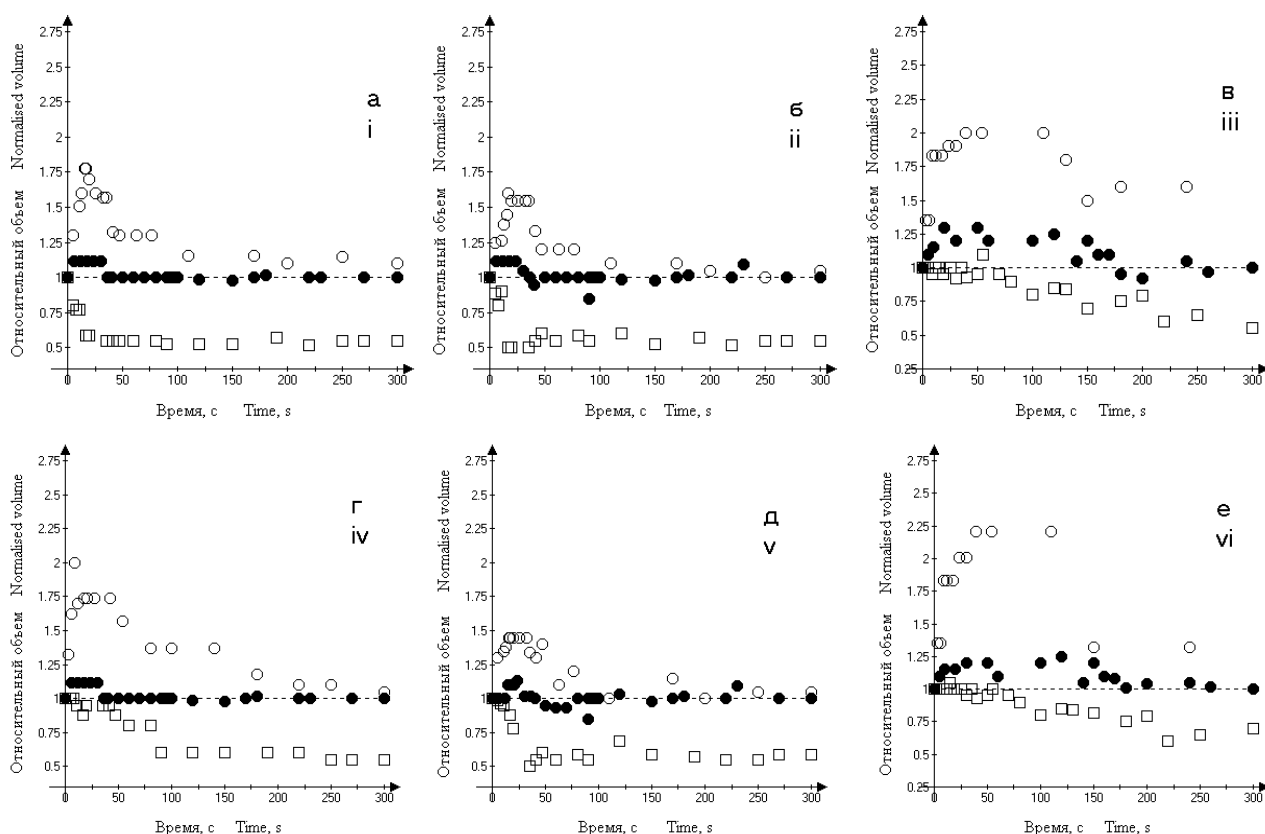


Рис. 1. Осмотическая реакция ядросодержащих клеток костного мозга мыши (а, б, в) и cordовой крови человека (г, д, е) при переносе их из растворов 1М ДМСО (а, г), 1,2 ПД (б, д) и глицерина (в, е) в физраствор (○), 0,5 М соответствующего криопротектора + 0,15М NaCl (●) и 0,5М NaCl (□), температура 18°C

Fig. 1. Osmotic response of nucleated cells of mice bone marrow (i,ii,iii) and human cord blood (iv,v,vi) when transferring out of the solutions of 1M DMSO (i,iv), 1,2-PD (ii,v) and glycerol (iii,vi) into physiological solution (○), 0.5 M of corresponding cryoprotectant + 0.15M NaCl (●) and 0.5 M NaCl (□), temperature of 18°C.

объема может объяснить, почему при двухэтапной отмывке (1→0,5→0М криопротектора) сохранность клеток значительно выше, чем при одноэтапной [10]. Плазматическая мембрана может повреждаться при переносе в среду со значительно меньшей тоничностью в результате ее чрезмерного растяжения. При более мягком изменении тоничности увеличение объема не столь значительно и клеточная мембрана испытывает меньшее растяжение. При использовании в качестве среды отмывки 0,5 М NaCl (данные показаны прямоугольниками на рис.1) увеличения объема клеток мы не наблюдали. По-видимому, такая концентрация непроницающего вещества препятствует поступлению воды в клетки, обусловленному разностью химических потенциалов для молекул криопротектора, тем самым предотвращая увеличение объема. В этом случае после выхода молекул криопротектора из клетки уменьшается клеточный объем.

Проницаемость в общем определяется как функция, соотносящая химический поток с градиентом химического потенциала. При сложном химическом потоке существует не только функция проницаемости для каждого вещества, но

milder change in the tonicity the volume increase is not so considerable and cellular membrane undergoes less stretching. When using as the medium for washing-out 0.5 M NaCl (Fig. 1, open squares) no increase in cell volume was observed. Probably such a concentration of non-penetrating substance prevents the entering of water into a cell, stipulated by the differences of chemical potentials for cryoprotectant molecules, by this preventing the volume increase. In this case after cryoprotectant molecule release out of a cell the cellular volume decreases.

Permeability in general is defined as the function of chemical flux and chemical potential gradient. In the case of multiple chemical flux not only the function of permeability for every substance exists, but a set of values, representing the interaction between them. In this paper two fluxes are of the most interest: water and cryoprotectant. As the most cells are highly permeable to water and the cryoprotectants under study, a coupled flow of both occurs.

The dynamics of this coupled transport controls the cell volume and intracellular concentration of cryoprotectant both during adding and removal, and

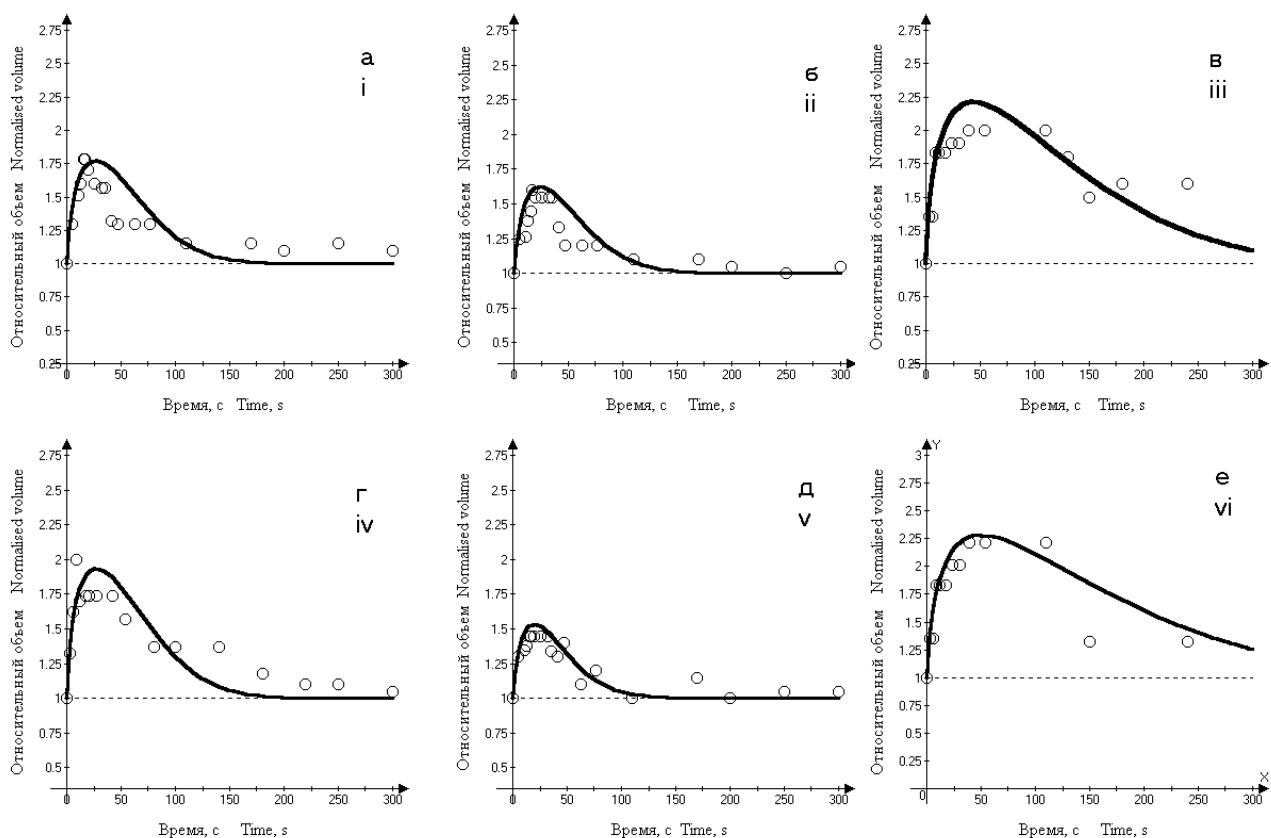


Рис. 2. Моделирование осмотической реакции ядросодержащих клеток костного мозга мыши и кордовой крови человека при переносе их из 1М растворов 1М ДМСО (а, г), 1,2 ПД (б, д) и глицерина (в, е) в физиологический раствор. (○)–экспериментальные значения, сплошная линия – данные, рассчитанные на основе модифицированных уравнений Кедем-Качальского.

Fig. 2. Modelling of osmotic reaction of nucleated cells of mice bone marrow (i, ii, iii) and human cord blood (iv,v,vi) under their transfer out of 1 M of the solutions of 1 M DMSO (i, iv), 1,2-PD (ii, v) and glycerol (iii, vi) to physiological solution. (○) – experimental values, solid line – the data, calculated on the base of modified Kedem-Katchalsky formalism.

и комплекс величин, представляющих взаимодействие между ними. В этой работе два потока представляют наибольший интерес: вода и криопротектор. Так как большинство клеток высокопроницаемы для воды и изучаемых криопротекторов, то осуществляется сопряженный поток этих веществ. Динамика этого сопряженного транспорта управляет клеточным объемом и внутриклеточной концентрацией криопротектора как при добавлении, так и удалении, и таким образом имеет большое значение в процессе криоконсервирования [8].

На рис. 2 представлены результаты процедуры подгонки экспериментальных данных и теоретически рассчитанных кривых для кинетики изменения клеточного объема при переносе клеток из 1М ДМСО, 1М 1,2-ПД и 1М глицерина в физиологический раствор. С их помощью были определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран для воды и криопротектора на этапе отмывки (таблица). Сравнение данных показателей с коэффициентами ядродержащих клеток кордовой крови и костного мозга на этапе эквilibрации клеток в растворах криопротекторов [3, 4] не показало статистически достоверной разницы между ними. Можно заключить, что молекулы воды и криопротектора входят в клетку и выходят из нее через одни и те же каналы.

Таким образом, проведенные исследования поведения ядродержащих клеток костного мозга, мышцы и кордовой крови человека на этапе отмывания от криопротекторов показали, что способ удаления криопротекторов отражается главным образом на степени регидратации клеток, которая может быть одной из основных причин их повреждения на этом этапе. Наши исследования подтвердили предположение, что срок пребывания клеток в регидратированном состоянии тем больше, чем ниже проницаемость клеточной мембраны для криопротекторов.

Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 144 с.
2. Калиниченко Т.А. Криоконсервирование гемопоэтических клеток кордовой крови для клинического применения: Дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 1999. – 189 с.
3. Холодный В.С. Осмотическое поведение и транспортные характеристики плазматических мембран ядродержащих клеток кордовой крови человека в гипертонических растворах проникающих криопротекторов // Пробл. криобиологии. – 2002. – №1. – С. 120-122.

Коэффициенты проницаемости плазматических мембран кордовой крови для молекул воды (L_p) и криопротекторов (K_1) на этапе отмывки (среднее±стандартное отклонение)

Permeability parameters of plasmatic membranes of cord blood for the water (hydraulic conductivity, L_p) and cryoprotectants (permeability coefficient, K_1) at the stage of washing-out (median±SD)

Cryoprotectant	$L_p, 10^{-13} \text{ l}^3/\text{h}/\text{l}$ $L_p, 10^{-13} \text{ m}^3/\text{s}/\text{N}$		$K_1, 10^{-7} \text{ l}/\text{h}$ $K_1, 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$	
	Bone marrow	Cord blood	Bone marrow	Cord blood
DM SO	1,05± 0,10	1,44± 0,15	0,72± 0,09	0,50± 0,10
1,2 PD	1,02± 0,15	1,40± 0,10	1,28± 0,16	1,37± 0,15
Glycerol	1,14± 0,10	1,32± 0,11	0,12± 0,08	0,19± 0,09

thus has a big value in the process of cryopreservation [8].

In Fig. 2. there are the results of the procedure of fitting of experimental data and theoretically calculated curves for the change in cellular volume when transferring the cells out of 1M DMSO, 1M 1,2-PD and 1 M glycerol into physiological solution. With their help we have determined the coefficient of permeability of plasmatic membranes to water and cryoprotectant at the stage of washing-out (table). Comparing these indices with the coefficients of nucleated cells of cord blood and bone marrow at the stage of cell equilibration in cryoprotectant solutions [3, 4] did not demonstrate the statistically true difference between them. One can conclude, that water and cryoprotectants molecules enter a cell and release out of it via the same channels.

Thus, performed investigations of the behaviour of nucleated cells of mice bone marrow and human cord blood at the stage of cryoprotectant washing-out have shown that the way of cryoprotectant removal affects mainly the degree of cell rehydration, which can be one of the basic causes of their damage at this stage. Our studies have confirmed the supposition that the term of cells' staying in rehydrated state the longer, the lower is the permeability of cellular membrane for cryoprotectants.

References

1. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cellular suspensions. – Kiev: Naukova dumka, 1994. – 114 p.
2. Kalinichenko T.A. Cryopreservation of hemopoietic cells of cord blood for clinical application: Thesis of the Candidate of Medical Sciences. – Kharkov, 1999. – 189p.
3. Kholodnyy V.S. Osmotic behaviour and plasmatic membrane transport characteristics of human cord blood nucleated cells in hypertonic solutions of penetrating cryoprotectants // Problems of Cryobiology. – 2002. – N 1. – P. 120-122.
4. Kholodnyy V.S., Rozanov L.F. Measurement of the permeability of plasma membrane of murine bone marrow cells to water and cryoprotectants // Biophysical Bulletin. – 2002. – N1. – С. 67-72.

4. *Kholodnyy V.S., Rozanov L.F.* Measurement of the permeability of plasma membrane of murine bone marrow cells to water and cryoprotectants // *Біофіз. вісник.*– 2002.– №1. – С. 67-72.
5. *Broxmeyer H.E.* Cord blood as an alternative source for stem and progenitor cell transplantation // *Current Opinion in Pediatrics.*– 1995.– 7. – P.47-55
6. *Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H. et al.* Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe 1999 // *Bone Marrow Transplantation.*– 2001.– 28.– P. 693–698
7. *Kedem O., Katchalsky A.* Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to nonelectrolytes // *Biochim Biophys. Acta.*– 1958. – 27.– P. 229-246.
8. *McGrath J.* Quantitative measurement of cell membrane transport: technology and application // *Cryobiology.* – 1997.– 34. – P.315-334.
9. *Perutelli P., Catellani S., Scarso L. et al.* Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery // *Vox Sang.* – 1999.– 76.– P. 237-240.
10. *Rubinsten P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical blood for unrelated bone marrow reconstitution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – 92. – P. 10119-10122.
11. *Vormoor J., Klingebiel T., Jürgens H.* Aktuelle Möglichkeiten der Behandlung mit blutbildenden Stammzellen aus Nabelschnurrblut im Kindesalter // *Klin. Pädiatr.*– 2002. – 214.– P. 195-200.
5. *Broxmeyer H.E.* Cord blood as an alternative source for stem and progenitor cell transplantation // *Current Opinion in Pediatrics.*– 1995.– 7. – P.47-55
6. *Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H et al.* Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe 1999 // *Bone Marrow Transplantation.*– 2001.– 28.– P. 693–698
7. *Kedem O., Katchalsky A.* Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to nonelectrolytes // *Biochim Biophys. Acta.*– 1958. – 27.– P. 229-246.
8. *McGrath J.* Quantitative measurement of cell membrane transport: technology and application // *Cryobiology.* – 1997.– 34. – P.315-334.
9. *Perutelli P., Catellani S., Scarso L. et al.* Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery // *Vox Sang.* – 1999.– 76.– P. 237-240.
10. *Rubinsten P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical blood for unrelated bone marrow reconstitution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – 92. – P. 10119-10122.
11. *Vormoor J., Klingebiel T., Jürgens H.* Aktuelle Möglichkeiten der Behandlung mit blutbildenden Stammzellen aus Nabelschnurrblut im Kindesalter // *Klin. Pädiatr.*– 2002. – 214.– P. 195-200.

Accepted in 29.10.2002

Поступила 29.10.2002