

Сравнение методов оценки жизнеспособности клеток эмбриональной печени человека после криоконсервирования

Н.Г. СКОРОБОГАТОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Comparison of Tests for Fetal Liver Cells Viability after Cryopreservation

SKOROBOGATOVA N.G.

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

Проведен сравнительный анализ результатов оценки жизнеспособности свежeweделенных и криоконсервированных клеток эмбриональной печени (КЭП) человека по неспецифическим тестам: витальному окрашиванию клеток трипановым синим, бромистым этидием (БЭ); гидролизу флюоресцеин диацетата (ФДА) во флюоресцеин; способности клеток к адгезии. Проведенные тесты отражают различные аспекты клеточной жизнеспособности. Окрашивание трипановым синим и бромистым этидием давало сходные результаты. ФДА-тест не выявляет действительное количество жизнеспособных КЭП. Комбинацией 3-х методов оценки жизнеспособности была выявлена фракция клеток, устойчивых к витальным красителям, в которых не обнаруживался флюоресцеин. Тест на неспецифическую адгезию позволяет исследовать сохранность клеток адгезивного пула эмбриональной печени. На фоне сохранения количества адгезировавших КЭП после криоконсервирования выявлены морфологические отличия клеток, прикреплявшихся к пластику, по сравнению с нативным контролем. Сочетанное использование указанных тестов позволяет давать более полную первичную характеристику гетерогенных суспензий недифференцированных клеток, в частности эмбриональной печени человека.

Ключевые слова: криоконсервирование, жизнеспособность, эмбриональная печень человека.

Проведено порівняльний аналіз результатів оцінки життєздатності нативних і криоконсервованих клітин ембріональної печінки (КЕП) людини за неспецифічними тестами: вітальним фарбуванням клітин трипановим синім, бромистим етидієм; гідролізом флюоресцеїн діацетату (ФДА) у флюоресцеїн; здатністю клітин до адгезії. Проведені тести відображали різні аспекти клітинної життєздатності. Фарбування трипановим синім і бромистим етидієм давало подібні результати. ФДА-тест не показує дійсну кількість життєздатних КЕП. Комбінацією 3-х методів оцінки життєздатності була виявлена фракція КЕП, стійких до вітальних барвників, в яких не знайдено флюоресцеїну. Тест на неспецифічну адгезію дозволяє досліджувати цілість клітин адгезивного пулу ембріональної печінки. При збереженні кількості адгезуючих КЕП після криоконсервування було виявлено морфологічні відмінності клітин, що прикріплювались до пластика, у порівнянні з нативним контролем. Сумісне використання зазначених тестів дозволяє давати більш повну первинну характеристику гетерогенних суспензій недиференційованих клітин, зокрема ембріональної печінки людини.

Ключові слова: криоконсервування, життєздатність, ембріональна печінка людини.

There was carried out a comparative analysis of the results on the estimation of viability for freshly isolated and cryopreserved human fetal liver (HFL) cells using non-specific tests: vital staining of cells with trypane blue, ethidium bromide (EB), fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis to fluorescein; ability of cell to adhesion. The performed tests reflect various aspects of cell viability. Staining with trypane blue and EB produced the similar results. FDA-test does not reveal a real number of viable HFL cells. The fraction of cells resistant to vital dyes, where no fluoresceine was found, was revealed by the combination of three methods of viability assessment. The non-specific adhesion test allows to estimate the integrity of HFL cells of adhesive pool. Simultaneously with keeping the number of adhesive HFL cells after cryopreservation there were found the morphological differences of cells, being adhered to the plastic, comparing to the native control. Combined usage of stated tests allows to provide the more complete primary characteristics of heterogenous suspensions of non-differentiated cells, in particular, HFL ones.

Key words: cryopreservation, viability, human fetal liver.

Внимание исследователей к клеткам-предшественникам эмбрионального происхождения обусловлено их высоким пролиферативным потенциалом и способностью дифференцироваться в различные клеточные типы. Сохранение уникальных свойств этих клеток требует усовершенствования протокола криоконсервирования. При этом важен оптимальный подбор экспресс-тестов оценки жизнеспособности клеток, на основании которых осуществляются дальнейшие дорогостоящие и

The attention of researches to progenitor cells of embryonic origin is stipulated by their high proliferative potential and ability to be differentiated to various cell types. The keeping of unique properties of these cells requires the improvement of the cryopreservation protocol. In this case the choice of express-tests for estimation of cell viability is important, which will serve as the base for optimizing the further expensive and long-term experimental study of cell functional activity. Testing of heterogenic suspensions of non-differen-

Адрес для корреспонденции: Скоробогатова Н.Г., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720135, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Skorobogatova N.G., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

длительные исследования функциональной активности. Особенно сложно тестировать гетерогенные суспензии недифференцированных клеток, полученных из эмбриональных тканей.

Цель данной работы – оценить сохранность КЭП человека после криоконсервирования по неспецифическим экспресс-тестам: прижизненному окрашиванию клеток трипановым синим и БЭ, внутриклеточному накоплению флюоресцеина в результате гидролиза ФДА, а также по способности клеток к адгезии.

Материалы и методы

Объектом исследования служили первичные суспензии свежeweделенных и криоконсервированных КЭП человека. Донорский материал был получен от эмбрионов 7-9 недель гестации после искусственного прерывания беременности и транспортировался в стерильных флаконах на льду. Изолированные КЭП получали неферментативным методом [3]. Клеточные суспензии криоконсервировали под защитой 5%-го ДМСО по программе [2], хранили в жидком азоте, размораживали на водяной бане при 40°C [11]. Оценку жизнеспособности клеток проводили по общепринятым методам прижизненного окрашивания трипановым синим [9] и БЭ/ФДА [5]. Адгезивную способность к культуральному пластику оценивали при эксплантации $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ в 24-луночные планшеты (“Costar”) в среде α MEM, дополненной 5% эмбриональной телячьей сыворотки, в стандартных условиях при 37°C, 100%-й влажности, 5% CO_2 . Криоконсервированные КЭП перед эксплантацией отмывали от ДМСО путем капельного добавления [4] сахарозо-солевого раствора [10] с последующим центрифугированием. Через определенные интервалы времени (1 и 18 ч) неприкрепившиеся клетки собирали в фиксированном объеме культуральной среды и подсчитывали их количество в камере Горяева. Прикрепившиеся клетки оценивали под инвертированным микроскопом после фиксации этанолом 70°.

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

Результаты и обсуждение

В суспензии свежeweделенных КЭП человека жизнеспособность клеток составляла: $87,3 \pm 2,1$ и $80,1 \pm 3,1\%$ по окрашиванию трипановым синим и БЭ соответственно (рис. 1,а). Результаты обоих тестов не имели статистически достоверных различий. В то же время количество флюоресцеин-положительных клеток было достоверно ниже показателей прижизненного окрашивания КЭП и

tiated cells with latent biological potential is of special difficulty.

The aim of this work was to evaluate the integrity of HFL cells after cryopreservation on non-specific express-tests: vital staining with trypane blue and ethidium bromide, intracellular accumulation of fluorescein after hydrolysis of fluorescein diacetate, and cell adhesion ability.

Materials and methods

Primary suspensions of freshly isolated and cryopreserved cells were the object of investigation. The donor material was obtained from 7-9 gestation weeks' embryos after abortions and delivered in sterile flasks on ice. HFL cells were isolated with non-enzymatic method [3]. Cell suspensions were cryopreserved under protection of 5% DMSO with elaborated program, and stored in liquid nitrogen. Suspensions were thawed on water bath at 40°C [11]. The estimation of cell viability was performed using standard methods of vital staining: with trypane blue [9], ethidium bromide and FDA [5]. Adhesive ability to culture plastic was evaluated during explantation of $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ into 24 well plate (Costar) in the α MEM medium added with 5% FCS, under standard conditions at 37°C, 100% humidity, 5% CO_2 . Cryopreserved HFL cells before explantation were washed out of DMSO by dropwise adding [4] of sucrose based solution [10] with further centrifugation. In the certain time intervals (1 and 18 hrs) non-adhered cells were collected in a fixed volume of cultural medium and their number was calculated in Goryaev's chamber. Adherent cells were estimated under inverted microscope after fixation with 70° ethanol.

Statistical analysis of results was done by non-parametrical method using the Wilcoxon matched pairs test. The results were presented as $M \pm m$.

Results and discussion

The viability of freshly isolated HFL cells was $87.3 \pm 2.1\%$ and $80.1 \pm 3.1\%$ on staining with trypane blue and ethidium bromide, correspondingly (Fig. 1a). The results of both tests had no statistically significant differences. At the same time the number of the fluorescein-positive cells was significantly lower in comparison with the results of vital staining of HFL cells, and made $48.5 \pm 2.0\%$ before freezing (Fig 1a).

This fact points that only in a part of HFL primary suspension cells with vital dye exclusion the fluorescein was revealed.

In the thawed samples together with the keeping of total cell number the HFL cell viability was significantly lower than that for freshly isolated cells in all three tests: $63.7 \pm 8.5\%$ on staining with trypane blue and $54.6 \pm 2.6\%$ with ethidium bromide, the number of fluorescein-positive cells decreased down to

составляло $48,5 \pm 2,0\%$ (рис. 1,а). Данный факт указывает на то, что только в части клеток первичной суспензии эмбриональной печени человека, неокрашенных витальными красителями, обнаруживается флюоресцеин.

В размороженных образцах на фоне сохранения общего количества клеток жизнеспособность КЭП была достоверно ниже соответствующих показателей свежесыведенных клеток по всем 3-м тестам: по окрашиванию трипановым синим – $63,7 \pm 8,5$; БЭ – $54,6 \pm 2,6\%$; количество флюоресцеин-положительных клеток снизилось до $24,3 \pm 2,2\%$ (рис. 1,б). Различия в количестве клеток, в которых обнаруживался флюоресцеин до и после криоконсервирования, могли быть обусловлены присутствием ДМСО в деконсервированных суспензиях. Поэтому от каждого образца криоконсервированных КЭП была отобрана 1/2 часть суспензии и проведена оценка жизнеспособности тех же клеток после отмывания от криопротектора [4]. Жизнеспособность клеток в данной группе по всем тестам оставалась на уровне соответствующих результатов в группе криоконсервированных КЭП без отмывания (данные не приведены).

Таким образом, снижение количества флюоресцеин-положительных клеток после криоконсервирования не было связано с присутствием ДМСО в реакционной среде. Это могло быть обусловлено гибелью клеток, потерей флюоресцеина живыми клетками вследствие дестабилизации их плазматических мембран после замораживания-отогрева, а также ингибированием эстераз после криоконсервирования, следствием чего было меньшее внутриклеточное накопление флюоресцеина.

В процессе криоконсервирования могут происходить повреждения клеточных структур без нарушения целостности плазматической мембраны. Поэтому следующей важной задачей работы являлось исследование элементарных функциональных свойств криоконсервированных клеток, в частности, способности клеток к адгезии, которая реализуется через сложный комплекс молекул класса адгезионных рецепторов. Эти белки, как известно, опосредуют взаимодействия клеток между собой и с внеклеточным матриксом. В эмбриогенезе адгезионные рецепторы вовлечены в важнейшие процессы клеточной миграции, пролиферации и дифференцировки и участвуют в морфогенезе тканей и органов [1].

В данной работе исследовали способность свежесыведенных и криоконсервированных КЭП прикрепляться к культуральному пластику в течение 1 и 18 ч. Относительное количество прикрепившихся клеток не зависело от продолжительности времени адгезии (1 и 18 ч) и не изменялось после криоконсервирования, составляя

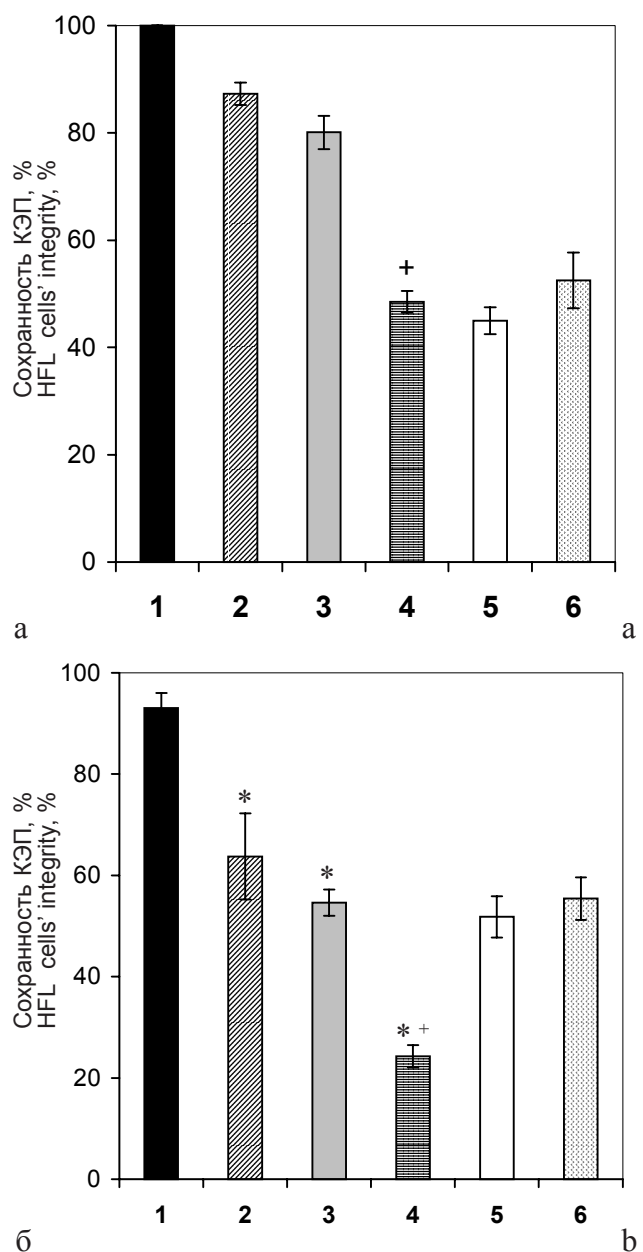


Рис.1. Сохранность КЭП до (а) и после (б) криоконсервирования, оцененная: 1 – по общему количеству клеток; 2 – окрашиванию трипановым синим; 3 – окрашиванию БЭ; 4 – внутриклеточному накоплению флюоресцеина; 5 – неспецифической адгезии (в течение 1 ч); 6 – неспецифической адгезии (в течение 18 ч).

* – различия статистически достоверны по сравнению с данными до криоконсервирования; + – различия статистически достоверны по сравнению с результатами прижизненного окрашивания (трипановым синим и БЭ), $p < 0,05$.

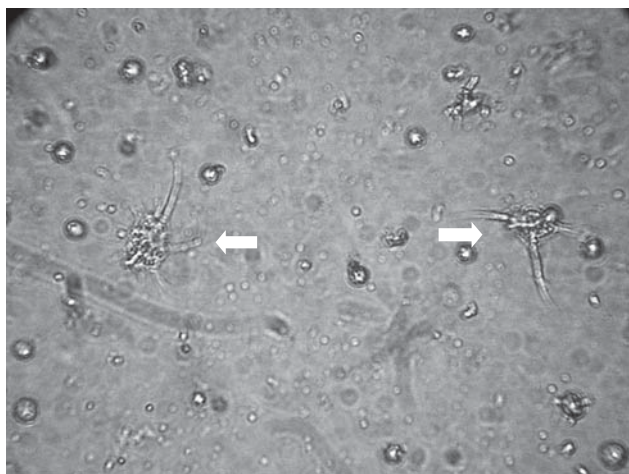
Fig.1. HFL cells' integrity before (a) and after (b) cryopreservation estimated by total cell number (1), trypan blue staining (2), ethidium bromide staining (3), intracellular accumulation of fluorescein (4), non-specific adhesion during 1 hr (5), and non-specific adhesion during 18 hrs (6). * – differences are significant comparing with data before cryopreservation; + – differences are significant comparing with results of vital staining (with trypan blue and ethidium bromide), $p < 0.05$.

в среднем около 50% от общего количества эксплантированных клеток (рис. 1, а, б). Во всех исследованных препаратах среди прикрепившихся клеток преобладали округлые клеточные элементы, вариабельные по размеру, без видимых признаков расплывания, с крупным ядром и узким ободком светлой цитоплазмы. Были отмечены некоторые морфологические особенности адгезировавших нативных и криоконсервированных КЭП. В образцах свежeweделенных клеток наблюдали распластавшиеся клетки различного размера с одним или несколькими выраженными лучеподобными изменениями клеточной поверхности (рис. 2, а, б). Эти клетки располагались одиночно или в непосредственной близости с одной или несколькими малыми округлыми клетками. В препаратах деконсервированных КЭП преобладали сферические клетки. Изредка встречались округлые распластанные клетки с тонким светлым ободком цитоплазмы (рис. 2, в), иногда они имели 1-2 цитоплазма-

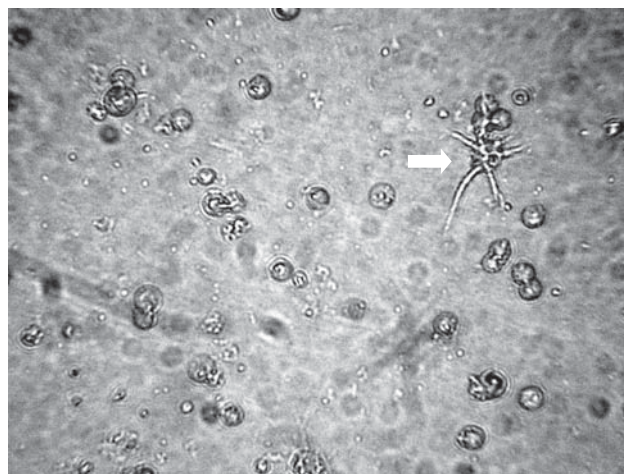
24.3±2,2% (Fig. 1 b). The differences in number of cells with revealed fluorescein before and after cryopreservation could be associated with DMSO presence in thawed suspensions. Therefore we took the half of each sample of cryopreserved HFL cells and examined the viability of these cells after cryoprotectant removal. Cell viability of this group estimated by all tests was at the level of the frozen-thawed cells without washing-out (data are not presented).

Thus, reduction of fluorescein-positive cell number after cryopreservation was not associated with DMSO presence in the reaction medium. It may be stipulated by cell damage, loss of fluorescein by alive frozen-thawed cell as a result of plasmatic membrane destabilization, and inhibition of esterase activity after cryopreservation, resulting in lower intracellular accumulation of fluorescein.

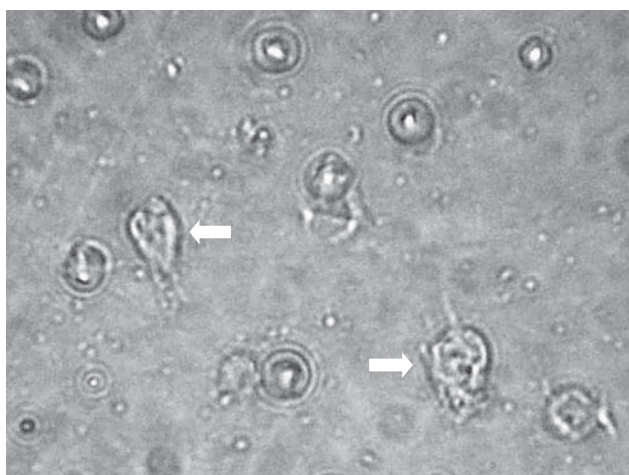
In cryopreservation process the damage of cell structures can occur without impairment of the cell integrity. Therefore the next important task was the



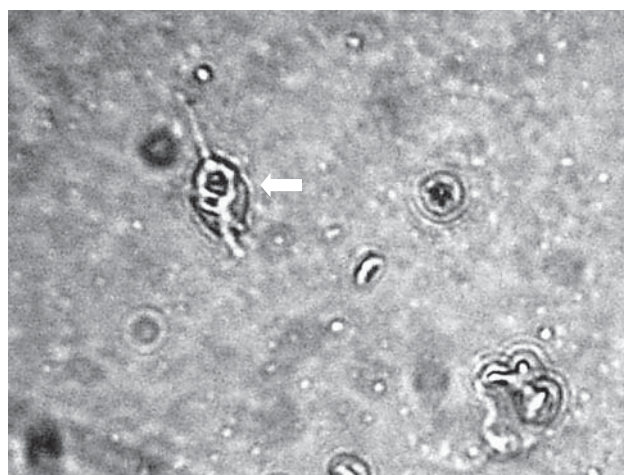
а



б



в



г

Рис.2. Адгезирующие КЭП человека свежeweделенные (а, б) и криоконсервированные (в,г). Адгезия к культуральному пластику в течение 1 ч. Увел.: ок. ×10, об. ×25.

Fig. 2. Adherent HFL cells: freshly isolated (a, b), and freeze-thawed (c, d). Adhesion to culture plastic during 1 hr. Magnification: ocular tube ×10, objective ×25.

тических отростка незначительной длины (рис. 2, г). Во всех клетках выявлялись крупные ядра.

Известно, что адгезия клеток – это активный многостадийный процесс, который зависит от связывания адгезионных рецепторов с их лигандами или субстратом, цитоскелетных перестроек и формирования фокальных контактов, которые необходимы для усиления прикрепления [6]. Установлено, что способность рецептора связываться с его лигандом и усиливать адгезию может быть изменена действием других стимулов [8]. Возможно, кратковременный контакт КЭП с криопротектором ДМСО до замораживания и после отогрева, а также собственно процедура криоконсервирования могут изменять функциональное состояние плазматических мембран, цитоскелетных структур и адгезионных рецепторов КЭП, что и проявилось в различном адгезивном поведении *in vitro* исследованных клеток.

Интересным было сравнение результатов всех проведенных неспецифических тестов. Жизнеспособность свежеизолированных КЭП человека составила свыше 80% согласно прижизненному окрашиванию трипановым синим и БЭ. В среднем около 50% КЭП в первичной суспензии были флюоресцеин-положительными. В то же время 50% от общего количества нативных КЭП были способны прикрепляться к пластику как через 1 ч, так и через 18 ч. Эти данные свидетельствуют, что около 30% жизнеспособных КЭП были неадгезирующими и такое же количество КЭП, в которых не обнаруживался флюоресцеин. Как известно, большинство КЭП ранних сроков гестации являются гемопоэтическими, среди которых эритроидные предшественники преобладают. Кроме того, установлено, что гемоглобин оказывает сильный маскирующий эффект на флюоресценцию флюоресцеина [7]. Можно предположить, что более зрелые эритробласты эмбриональной печени человека, содержащие фетальный гемоглобин, являются кандидатами в те 30% жизнеспособных нефлюоресцирующих КЭП, и, возможно, неспособны к неспецифической адгезии.

После криоконсервирования по разработанной программе было отмечено сохранение общего количества клеток и снижение количества КЭП, устойчивых к прижизненным красителям по сравнению с нативным контролем. Гибель клеток, оцененная по окрашиванию трипановым синим, составляла около 24%, БЭ – 26%; потеря флюоресцеин-положительных КЭП была в среднем 24%. Можно было бы считать, что указанные тесты выявляют одни и те же поврежденные клетки. Но при этом количество адгезировавших деконсервированных КЭП оставалось на уровне

исследования примитивных функциональных свойств криопродержанных клеток, в частности, способности клеток к адгезии, которая реализуется через комплекс молекул из класса адгезионных рецепторов. Эти белки известны как медиаторы взаимодействий клеток и внеклеточного матрикса. В эмбриогенезе адгезионные рецепторы участвуют в важных процессах миграции, пролиферации и дифференциации и принимают участие в тканевом и органогенезе [1].

В этой работе мы исследовали способность свежеезолированных и криопродержанных HFL клеток адгезировать к культуре пластика в течение 1 и 18 часов. Относительное количество адгезировавших клеток не зависело от времени адгезии (1 и 18 часов) и не изменилось после криопродержания, составляя в среднем около 50% от общего числа засеянных клеток (рис. 1а, б). Во всех исследованных образцах среди адгезировавших клеток мы наблюдали округлые клеточные элементы, различающиеся по размеру, без видимых признаков расползания, имеющие крупное ядро и узкую светлую кайму цитоплазмы. Некоторые морфологические особенности адгезировавших нативных и криопродержанных HFL клеток были отмечены. В образцах свежеезолированных клеток мы наблюдали расползшиеся клетки различного размера с одной или несколькими выраженными лучевидными деформациями поверхности (рис. 2а, б). Расположение этих клеток было одиночным или вблизи одного или нескольких мелких округлых клеток. В образцах размороженных HFL клеток преобладали округлые клетки. В некоторых случаях мы наблюдали расползшиеся клетки с узкой светлой каймой цитоплазмы (рис. 2с), некоторые из этих клеток имели 1-2 цитоплазматические отростки незначительной длины (рис. 2д). Во всех этих клетках были выявлены крупные ядра.

Адгезия клеток известна как активный многостадийный процесс, который зависит от связывания адгезионных рецепторов с их лигандами или субстратом, перестройки цитоскелета и формирования фокальных контактов, необходимых для усиления адгезии [6]. Установлено, что способность рецептора связываться с его лигандом и усиливать адгезию может быть изменена действием других стимулов [8]. Возможно, кратковременный контакт HFL клеток с ДМСО криопротектором перед замораживанием и после размораживания, а также процедура криоконсервирования могут изменить функциональное состояние плазматических мембран, цитоскелетных структур и адгезионных рецепторов HFL клеток, что и проявилось в различном адгезивном поведении *in vitro*.

Интересно было сравнить результаты всех проведенных неспецифических тестов. Жизнеспособность свежеезолированных HFL клеток была выше 80% согласно окраске трипановым синим и БЭ. В среднем около 50% от общего количества HFL клеток были флюоресцеин-положительными. В то же время 50% от общего количества нативных HFL клеток были способны прикрепляться к пластику как через 1 ч, так и через 18 ч. Эти данные свидетельствуют, что около 30% жизнеспособных HFL клеток были неадгезирующими и такое же количество HFL клеток, в которых не обнаруживался флюоресцеин. Как известно, большинство HFL клеток ранних сроков гестации являются гемопоэтическими, среди которых эритроидные предшественники преобладают. Кроме того, установлено, что гемоглобин оказывает сильный маскирующий эффект на флюоресценцию флюоресцеина [7]. Можно предположить, что более зрелые эритробласты эмбриональной печени человека, содержащие фетальный гемоглобин, являются кандидатами в те 30% жизнеспособных нефлюоресцирующих HFL клеток, и, возможно, неспособны к неспецифической адгезии.

нативного контроля – в среднем около 50% как через 1ч, так и через 18 ч адгезии. Таким образом, неясно, какие именно КЭП становятся поврежденными. В то же время было установлено, что после размораживания только часть адгезировавших клеток были флюоресцеин-положительными, возможно, в результате ингибирования эстераз после криоконсервирования.

Выводы

Рассмотренные тесты отражают отдельные аспекты жизнеспособности клеток и являются взаимодополняющими. Сочетанное их применение может быть использовано для более полной первичной характеристики гетерогенных суспензий криоконсервированных клеток, в частности, эмбриональной печени, для которых характерен скрытый биологический потенциал. Прижизненное окрашивание КЭП трипановым синим и БЭ дает сходные результаты. FDA-тест не отражает действительное количество жизнеспособных КЭП. При этом комплексная оценка жизнеспособности по описанным 3-м тестам позволила определить не только количество КЭП человека с поврежденными мембранами, но и наличие фракции клеток, устойчивых к витальным красителям, в которых не обнаруживался накапливавшийся флюоресцеин. Статус и судьба последних остаются не ясными и требуют более детальных исследований. Тест на неспецифическую клеточную адгезию к культуральному пластику имеет важное значение как обязательный этап перед культивированием *in vitro* и как предварительная функциональная характеристика адгезивного пула КЭП человека. Необходимо отметить, что количественная оценка пула адгезирующих клеток должна быть дополнена исследованием их морфологических свойств. Выявление же криочувствительности отдельных клеточных типов в гетерогенных суспензиях – это следующая задача, решение которой возможно при условии привлечения методов фенотипирования исследуемых эмбриональных клеток и культивирования.

Литература

1. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии человека // Успехи совр. биологии.– 1994.– Т.114.– №6.– С. 741-753.
2. Грищенко В.И., Тарасов А.И., Руденко С.В., Петренко А.Ю. Чувствительность к программному и циклическому замораживанию – отогреву клеток эмбриональной печени человека 7-12 недель гестации // Пробл. криобиологии.– 2000.– №4.– С.37-44.
3. Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д., Мазур С.П. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия.– 1991.– Т.56, №9.– С. 1647-1651.

HFL cells were not adherent cells, and the same number of the HFL cells did not reveal the fluorescein presence.

The majority of HFL cells of early gestation stage are known to be hemopoietic progenitor cells, among them erythropoietic cells predominate. Furthermore it is established, that hemoglobin exhibits a strong masking effect on the fluorescence of fluorescein [7]. So we can suppose, that more mature HFL erythroblasts, containing fetal hemoglobin, can be the candidates for those 30% viable non-fluorescent HFL cells, which may be unable to nonspecific adhesion.

After cryopreservation procedure according to the elaborated program we have found the preservation of total cell number and decrease of cell amount, being resistant to vital dyes, comparing to the native control. The cell death was about 24% on trypane blue staining, and for ethidium bromide it was 26%. Loss of the fluorescein-positive cell quantity was about 24%. These tests were supposed to detect the same damaged cells. However the amount of adherent cells remained at the native level, about 50%. So it is unknown what cells became damaged. Whereas it is clear, that only a part of the adherent cells were fluorescein-positive. It may be as a result of esterase inhibition after cryopreservation.

Conclusions

Performed tests demonstrated some aspects of cell viability and amplify each other. Their combined application could be used for more complete primary characteristics of heterogeneous suspensions of cryopreserved cells, in particular of embryonic liver, being characterised with a latent biological potential. Vital staining of HFL cells with trypane blue and ethidium bromide shows the similar results. FDA-test does not display a real number of viable HFL cells. In this case co-application of FDA-test with the vital staining allowed to determine the presence of HFL cells, excluding the vital dyes, but not revealing the fluorescein accumulation. Their state and fate are not clear and it requires more detailed investigations. The test for non-specific cell adhesion on culture plastic has a great importance as the essential step before culturing *in vitro* and the initial functional test for HFL cells adhesive pool. It should be noted, that quantitative evaluation of adherent cells needs to be combined with investigation of morphological properties of these cells. Revealing of cryosensitivity of separate cell types in heterogenous suspensions is the next task, the solving of which is possible in case of involving the methods of phenotyping of studied fetal cells and culturing.

4. *Скоробогатова Н.Г., Грищук В.П., Петренко А.Ю.* Влияние условий удаления криопротектора ДМСО на жизнеспособность и колониюобразующую активность клеток эмбриональной печени человека // Пробл. криобиологии.– 2002.– №4.– С. 16-23.
5. *Dankberg F., Persidsky M.D.* A test of granulocyte integrity and phagocytic function // *Cryobiology.*– 1976.– Vol.13.– P. 430-432.
6. *Pavalko F.M., Otey C.A.* Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*– 1994.– Vol.205(4)– P. 282-293.
7. *Persidsky M. D., Baillie G. S.* Fluorometric test of cell membrane integrity // *Cryobiology.*–1977.– Vol. 14, N3.– P.322-331.
8. *Sanchez-Mateos P., Cabanas C., Sancez- Madrid F.* Regulation of integrin function // *Semin. Cancer Biol.*– 1996.– Vol.7(3)– P. 99-107.
9. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell. Biol.*– 1976.– N13.– P. 29-83.
10. *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.– Vol.41.– P. 315-318.
11. *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 26.05.2003.

References

1. *Botsenovskiy B.A., Baryshnikov A.Yu.* Cell adhesion molecules in human // *Uspekhi Sovr. Biol.*– 1994.– Vol.114, N6.– P. 741-753.
2. *Grischenko V.I., Tarasov A.I., Rudenko S.V., Petrenko A.Yu.* Sensitivity to a programmed and cyclic freeze-thawing of human embryonic liver cells of 7-12 weeks of gestation // *Problems of Cryobiology.*– 2000.– N4.– P.37-44.
3. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Roslyakov A.D.* Isolation of rat hepatocytes by a non-enzymatic method: detoxication and breathing activity // *Biokhimiya.*– 1991.– Vol.56, N9.– P. 1647-1651.
4. *Skorobogatova N.G., Grischuk V.P., Petrenko A.Yu.* Influence of Me₂SO Cryoprotectant removal conditions to viability and colony forming activity of cryopreserved cells of human fetal liver // *Problems of Cryobiology.*– 2002.– N4.– P. 16-23.
5. *Dankberg F., Persidsky M.D.* A test of granulocyte integrity and phagocytic function // *Cryobiology.*– 1976.– Vol.13.– P. 430-432.
6. *Pavalko F.M., Otey C.A.* Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*– 1994.– Vol.205(4)– P. 282-293.
7. *Persidsky M. D., Baillie G. S.* Fluorometric test of cell membrane integrity // *Cryobiology.*–1977.– Vol. 14, N3.– P.322-331.
8. *Sanchez-Mateos P., Cabanas C., Sancez- Madrid F.* Regulation of integrin function // *Semin. Cancer Biol.*– 1996.– Vol.7(3)– P. 99-107.
9. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell. Biol.*– 1976.– N13.– P. 29-83.
10. *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.– Vol.41.– P. 315-318.
11. *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.

Accepted in 26.05.2003.