

Криоконсервирование клеток эмбриональной печени человека с использованием ДМСО и высокомолекулярных полимеров

Ю.А.ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Human Embryonic Liver Cells Using DMSO and High Molecular Weight Polymers

PETRENKO YU.A.

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

Изучали влияние высокомолекулярных соединений (декстрана, ПЭО-1500, ПЭО-3500, ПЭО-8000) в сочетании с различными концентрациями ДМСО при криоконсервировании КЭП человека. Показано, что декстран не оказывает защитного действия на КЭП при криоконсервировании. В то же время добавление ПЭО с различными молекулярными массами способствует высокой степени сохранности деконсервированных КЭП человека. Защитное действие ПЭО зависит от молекулярной массы и усиливается с ее увеличением. Найдена оптимальная концентрация ПЭО-8000 (6%) с минимальной концентрацией ДМСО (2%), способная обеспечить хороший криозащитный эффект для КЭП человека. При данных концентрациях криопротекторов уровень сохранности был значительно выше, чем при использовании в качестве криопротектора 10% ДМСО, как при наличии 10% эмбриональной сыворотки, так и без нее.

Ключевые слова: криоконсервирование, гемопоэтические клетки, эмбриональная печень, криопротекторы, полиэтиленоксид.

Вивчали вплив високомолекулярних з'єднань (декстрану, ПЕО-1500, ПЕО-3500, ПЕО-8000) у сполученні з різними концентраціями ДМСО при криоконсервуванні КЕП людини. Показано, що декстран не має захисної дії на КЕП при криоконсервуванні. Тим часом додавання ПЕО з різними молекулярними масами сприяє високого ступеня схоронності деконсервованих КЕП людини. Захисна дія ПЕО залежить від молекулярної маси і підсилюється з її збільшенням. Знайдено оптимальну концентрацію ПЕО-8000 (6%) з мінімальною концентрацією ДМСО (2%), яка здатна забезпечити гарний криозахисний ефект для КЕП людини. При даних концентраціях криопротекторів рівень схоронності був значно вище, ніж при використанні в якості криопротектора 10% ДМСО, як при наявності 10% ембріональної сироватки, так і без неї.

Ключові слова: криоконсервування, гемопоетичні клітини, ембріональна печінка, криопротектори, поліетиленоксид.

In this study an influence of high molecular polymers (Dextran, PEO-1500, PEO-3500, PEO-8000) in combination with different concentrations of DMSO was investigated. It is shown that the adding of 10% dextran into cryopreservation media increased neither survival nor viability rates of FL cells after cryopreservation with all the concentrations of DMSO used. At the same time adding of 10% PEO with different molecular weight facilitated the increasing of survival of FL cells. We can see that survival rate depends on molecular weight of PEOs and has been increased with enhancement of molecular weight. Optimal concentration of PEO-8000 (6%) with minimal concentration of DMSO (2%) was found. In these concentrations of CPAs survival rate was significantly higher than with 10% DMSO alone as well as in the presence of fetal calf serum (FCS).

Key-words: cryopreservation, human fetal cells, embryonic liver, cryoprotectants, polyethylenoxide.

Стволовые клетки (СК) являются объектом пристального внимания исследователей клеточной биологии, экспериментальной и клинической медицины. С их терапевтическим применением связывают надежды на прорыв в лечении онкологических, гематологических [4], неврологических заболеваний и приобретенных иммунодефицитов [12]. Одним из наиболее богатых источников стволовых кроветворных клеток является эмбриональная печень ранних сроков гестации (7-10 недель у человека). В этот период печень эмбриона содержит незрелые предшественники всех кроветворных ростков, включая полипотентные стволовые кроветворные клетки, характери-

Stem cells are the objects of thorough attention of the researchers of cell biology, experimental and clinical medicine. The break-down in treatment of oncological, haematological [4], neurological diseases and acquired immune deficits [12] is related to their therapeutic application. One of the richest sources of stem hemopoietic cells is fetal liver (FL) of early gestation terms (7-10 weeks in human being). Within this period the liver of embryo comprises immature precursors of all hemopoietic lineages, including polypotent stem haemopoietic cells, characterising with high differentiative and proliferative potentials.

A wide clinical application of FLCs foresees the

Адрес для корреспонденции: Петренко Ю.А. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7702935, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Petrenko Yu.A. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7702935, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

зующиеся высоким дифференцировочным и пролиферативным потенциалами.

Широкое клиническое применение КЭП предусматривает создание достаточного запаса трансплантационного материала, т.е. разработку методов их криоконсервирования и низкотемпературного хранения. Для достижения высокой степени сохранности деконсервированного материала составы сред и режимы криоконсервирования КЭП человека постоянно совершенствуются. В настоящее время для криоконсервирования КЭП человека применяется медленное 2- или 3-ступенчатое замораживание в среде, содержащей ДМСО в концентрациях 5-10% [1,2]. ДМСО в составе криозащитной среды, с одной стороны, позволяет сохранить жизнеспособность (ЖС), но с другой, ДМСО обладает выраженной токсичностью, что приводит к повреждению части клеток на этапе эквilibрации и требует его отмывки перед трансплантацией. Поэтому для усовершенствования метода криоконсервирования требуется снизить концентрацию ДМСО. Часто в состав криозащитной среды включают 10-90% эмбриональной сыворотки коров или лошадей, что способствует стабилизации клеточных мембран, выравнивает осмотическое и онкотическое давление, позволяет добиться хороших результатов криоконсервирования [6]. Вместе с тем в сыворотке содержатся белки и пептиды, способные вызвать иммунную реакцию при трансплантации. Следовательно, для применения КЭП человека в клинике желательнее исключить сыворотку как ксеногенный и иммунореактивный компонент.

Цель работы – снизить концентрацию ДМСО КЭП человека, исключить сыворотку из среды криоконсервирования. Для достижения этой цели было предложено использовать полимеры высокой молекулярной массы, способные связывать внеклеточную воду и уменьшать вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда.

Наиболее часто применяются высокомолекулярные криопротекторы гидроксиэтилкрахмал [5], декстран [9], поливинилпирролидон [11], полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой [3].

В данной работе проведена сравнительная оценка целесообразности использования таких высокомолекулярных соединений, как декстран (Mm=100000) и ПЭО (Mm=1500, 3500, 8000) отдельно или в сочетании с ДМСО в различных концентрациях для криоконсервирования КЭП человека. Для контроля использовали среды, содержащие различные концентрации ДМСО при отсутствии или в присутствии эмбриональной сыворотки.

creation of sufficient stocks of transplantation material, i.e. the elaboration of the methods of their cryopreservation and low temperature storage. To achieve a high rate of survival of frozen-thawed material the compositions of media and cryopreservation regimens of FLCs are under constant improvement. Nowadays for HFLCs cryopreservation there is applied slow two- and three-step freezing in the medium with DMSO under concentration of 5-10% [1, 2]. DMSO as a part of cryoprotective medium from one hand allows the saving of viability, but from another, it has a manifested toxicity that results to the damage of some cells at the stage of equilibration and requires its washing-out before transplantation. Therefore to improve the cryopreservation method it is necessary to reduce the concentration of DMSO. Frequently to the composition of cryoprotective medium 10-90% of embryonic sera of cows or horses are added, that contributes to the stabilisation of cell membranes, smoothes up osmotic and oncotic pressure, allows to reach good cryopreservation results [6]. Along with this in the serum there are proteins and peptides capable to cause an immune reaction during transplantation. Therefore for applying the HFLCs in clinic it would be better to exclude the serum as xenogeneic and immune reactive component.

The aim of this work is to reduce the concentration of DMSO and to exclude the serum from cryopreservation medium.

To approach these goals we proposed to use the polymers of high molecular weight, which are capable to bind an extracellular water and decrease the probability of the formation of intracellular ice crystals.

Hydroxyethylstarch [5], dextran [9], polyvinylpyrrolidone [11], polyethylene glycols (PEG) of various molecular mass [3] are the most frequently used cryoprotectants with high molecular weight.

In this work there was performed a comparative assessment of application expediency for such compounds with high molecular weight as dextran (Mm= 100000) and PEO (Mm = 1500, 3500, 8000) separately and in combination with DMSO under various concentrations for HFLCs cryopreservation.

As the control we used the media, containing various DMSO concentrations with or without embryonic serum.

Materials and methods

Human fetal liver was derived from abortuses of 7-10 gestation weeks after an artificial termination of pregnancy and written donor's consent. Donor's material was transported to the laboratory in sterile flasks on ice. Suspension of FLCs was

Материалы и методы

Эмбриональную печень человека получали от абортусов 7-10 недель гестации после искусственного прерывания беременности и письменного согласия доноров. Донорский материал транспортировали в лабораторию в стерильных флаконах на льду. Суспензию КЭП получали неферментативным методом. Клеточную суспензию разводили средой Дюльбекко до концентрации 2 млн/мл и разливали в пластиковые криоконтейнеры фирмы Nunc по 0,5 мл. Затем к суспензии осторожно по каплям добавляли равные объемы различных криозащитных сред, приготовленных в двойной концентрации. Конечная концентрация клеток составляла 1 млн/мл. В качестве криозащитных сред использовали ДМСО (2, 5, 10%) и высокомолекулярные соединения: декстран (Mm=100000), эмбриональную сыворотку телят (ЭСТ), ПЭО (Mm=1500, 3500, 8000) в концентрации 10%. Программное замораживание производили в три этапа: до температуры -40°C со скоростью 1 мин, до -80°C со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, после чего образцы погружали в жидкий азот. Отогревали на водяной бане при температуре 40°C .

Деконсервированные суспензии КЭП отмывали от криозащитной среды центрифугированием при 400g 10 мин в среде Дюльбекко в присутствии или при отсутствии 10% ЭСТ.

Сохранность КЭП до и после криоконсервирования определяли по окрашиванию витальным красителем трипановым синим. Количество клеток было подсчитано в камере Горяева.

Сохранность КЭП была рассчитана по формуле

$$C = \frac{Ж}{K} \times 100\%,$$

где Ж – количество живых клеток; K – общее количество клеток.

Жизнеспособность определяли по формуле

$$ЖС = \frac{C_1 K_1}{C_0 K_0} \times 100\%,$$

где C_0 – сохранность свежeweделенных клеток; C_1 – сохранность КЭП после криоконсервирования; K_0 – количество свежeweделенных клеток; K_1 – количество КЭП после криоконсервирования.

Для оценки достоверности различий между группами данных использовали критерий Вилкоксона, считая достоверными различия с показателем значимости $p < 0,05$. Оценка проводилась с помощью программы Origin v. 6.1.

Результаты и обсуждение

Сохранность свежeweделенной суспензии КЭП человека составляла $85 \pm 2\%$. После быстрого отогрева КЭП, криоконсервированных по трехэтапной программе при отсутствии криопротек-

obtained with non-enzymatic method. Cell suspension was diluted with Dulbecco medium up to the concentration of 2 mln/ml and poured into plastic cryocontainers (Nunc) by 0.5 ml, then the volume aliquots of various cryoprotective media, prepared in double concentration were thoroughly added to the suspension by drops. Final concentration of cells made 1 mln/ml. As cryoprotective media we used DMSO (2, 5, 10%) and compounds with high molecular weight: dextran (Mm=100000), fetal calf serum (FCS), PEO (Mm = 1500, 3500, 8000) under 10% concentration.

Programmable freezing was performed in three stages: down to the temperature of -40°C with the rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, down to -80°C with the rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, afterwards the samples were immersed to liquid nitrogen. Thawing was accomplished on water bath at 40°C .

Frozen-thawed FLCs suspensions were washed-out of cryoprotective medium by centrifugation at 400g for 10 min in Dulbecco medium with or without 10% FCS.

FLCs survival before and after cryopreservation was found on the staining by trypan blue vital dye. The number of cells was calculated in Goryaev's chamber.

The survival of HFLCs was calculated according to the formula:

$$S = \frac{V}{C} \times 100\%,$$

Where, V – the number of viable cells, C – total number of cells.

Viability was determined with the formula:

$$Viability = \frac{S_1 C_1}{S_0 C_0} \times 100\%,$$

where S_0 – survival of freshly isolated cells;

S_1 – survival of FLCs after cryopreservation;

C_0 – the number of freshly isolated cells;

C_1 – the number of FLCs after cryopreservation;

To estimate the significance of true differences between the groups of data we used the criterion of non-parametric Wilcoxon method, assuming the differences as statistically significant with the value $p < 0.05$. The assessment was carried-out using the Origin v. 6.1. software.

Results and discussion

The survival of freshly isolated suspension of HFLCs made $85 \pm 2\%$. After rapid thawing of FLCs, cryopreserved according to three-stage programme in the absence of cryoprotectants, the viability made $14 \pm 2\%$ (Table 1). Introduction of 2% DMSO to the freezing medium resulted in more than 2-fold increase of viability. The rise in DMSO concentration up to 5% and 10% allowed to reach higher

текторов ЖС составляла $14 \pm 2\%$ (табл.1). Введение 2% ДМСО в среду замораживания приводило более чем к 2-кратному увеличению ЖС. Повышение концентрации ДМСО до 5 и 10% позволило добиться более высоких показателей ЖС. Максимальная сохранность клеток ($63 \pm 1\%$) была выявлена при использовании 10% ДМСО. Добавление в среду криоконсервирования 10% ЭСТ увеличивало сохранность КЭП в 1,5 раза при концентрациях ДМСО 0 и 2%. При повышении концентрации ДМСО до 5 и 10% влияние ЭСТ снижалось и при концентрации 10% было незначительным (табл.1).

Введение в состав среды криоконсервирования декстрана не приводило к увеличению сохранности КЭП человека при всех использованных концентрациях ДМСО, а ПЭО способствовало улучшению жизнеспособности КЭП человека.

Таблица 1. Влияние высокомолекулярных полимеров на сохранность КЭП человека до и после отмывки криопротекторов

Table 1. Effect of polymers with high molecular weight on HFLCs survival before and after washing-out of cryoprotectants

Сохранность КЭП до отмывки, % FLCs integrity before thawing, %				
Полимеры Polymers	Концентрация ДМСО, % DMSO concentration, %			
	0	2	5	10
Контроль Control	14 ± 2	30 ± 4	40 ± 2	63 ± 1
Декстран Dextran	14 ± 1	25 ± 1	44 ± 2	
ЭСТ FCS	21 ± 2	43 ± 1	49 ± 3	66 ± 4
ПЭО – 1500 PEO – 1500	49 ± 2	59 ± 2	65 ± 2	
ПЭО – 3500 PEO – 3500	55 ± 2	70 ± 3	74 ± 4	
ПЭО – 8000 PEO – 8000	63 ± 4	78 ± 4	76 ± 4	
Сохранность КЭП после отмывки, % FLCs integrity after thawing, %				
Контроль Control	19 ± 2	34 ± 5	43 ± 5	65 ± 1
Декстран Dextran	16 ± 1	23 ± 3	44 ± 2	
ЭСТ FCS	21 ± 3	42 ± 3	47 ± 2	68 ± 3
ПЭО – 1500 PEO – 1500	51 ± 3	56 ± 3	67 ± 2	
ПЭО – 3500 PEO – 3500	55 ± 2	67 ± 2	70 ± 2	
ПЭО – 8000 PEO – 8000	63 ± 6	74 ± 2	71 ± 4	

indices of viability. Maximum survival of cells ($63 \pm 1\%$) was found when using 10% DMSO. Adding into cryopreservation medium f 10% FCS increased the FLCs survival in 1.5 times under 0 and 2% DMSO concentration. When increasing DMSO concentration up to 5 and 10% the effect of FCS reduced and under concentration of 10% was insignificant (Table 1).

The dextran introduction into cryopreservation medium composition did not result into a rise in human FLCs survival under all used DMSO concentrations, and PEO contributed to the improvement of human FLCs viability. Even at the absence of DMSO the adding of PEO-1500 either PEO-3500, or PEO-8000 in 3-4 times increased the indices of cell survival. With an enhancement of molecular mass a protective effect of PEO slightly increased. Maximum survival of FLCs when using PEO-8000 corresponded the survival level obtained after cryopreservation with 10% DMSO.

When rising the DMSO concentration up to 2 % of the best survival indices were possible the with the use of PEO-3500 and PEO-8000. Human FLCs survival when adding these polymers was statistically true higher than when using 10% DMSO in the absence or presence of FCS. In the presence of 5% DMSO all PEOs vividly manifested a protective effect. Under these conditions when using PEO-3500 and PEO-8000 the survival was statistically true higher that at the absence of the compounds with high molecular weight at 5 and 10% DMSO and did not differ from the survival level of freshly isolated cells (Table 1).

After washing-out there was not observed statistically true changes in the parameters of FLCs survival (Table 1). Thus, after cryopreservation at the absence of cryoprotectant it made $19 \pm 2\%$. When rising the concentration of DMSO the survival of FLCs increased according to concentration dependence and reached the maximum ($65 \pm 1\%$) under 10% concentration. In the presence of FCS the FLCs survival was slightly higher at 0 and 2% DMSO and practically did not differ from the control at 5 and 10%.

Because of the loss of a part of the cells after cryopreservation the indices of viability were lower in comparison with those for the survival, however the character of these two indices remained similar. Thus, viability, calculated according to the formula (2) made $6 \pm 1\%$ after cryopreservation without cryoprotectant. When adding 2% DMSO to the cryopreservation medium it increased up to $15 \pm 2\%$. After increasing the DMSO concentration, the maximum viability of FLCs ($53 \pm 4\%$) was reached at 10% DMSO (Table 2). Dextran used as a cryoprotective substance did not improve the FLCs

Даже при отсутствии ДМСО, добавление ПЭО-1500 или ПЭО-3500 или ПЭО-8000 в 3-4 раза увеличивало показатели сохранности клеток. С увеличением молекулярной массы защитное действие ПЭО несколько повышалось. Максимальная сохранность КЭП при использовании ПЭО-8000 соответствовала уровню сохранности, полученному после криоконсервирования с 10% ДМСО.

При увеличении концентрации ДМСО до 2% наилучших показателей сохранности удалось добиться с использованием ПЭО-3500 и ПЭО-8000. Сохранность КЭП человека при добавлении этих полимеров была достоверно выше, чем при 10% ДМСО при отсутствии или наличии ЭСТ. В присутствии 5% ДМСО ПЭО проявляли ярко выраженное защитное действие. В этих условиях с использованием ПЭО-3500 и ПЭО-8000 сохранность была достоверно выше, чем при отсутствии высокомолекулярных соединений при 5 и 10% ДМСО и не отличалась от уровня сохранности свежевыведенных клеток (табл.1).

После отмывки не наблюдалось достоверных изменений в показателях сохранности КЭП (табл.1). Так, после криоконсервирования при отсутствии криопротектора она составила $19\pm 2\%$. При повышении концентрации ДМСО сохранность КЭП увеличивалась по концентрационной зависимости и достигала максимума ($65\pm 1\%$) при 10% концентрации. ЭСТ эмбриональной сыворотки сохранность КЭП была незначительно выше при 0 и 2% ДМСО и практически не отличалась от контроля при 5 и 10% ДМСО.

Вследствие потери части клеток после криоконсервирования показатели ЖС были меньше, чем сохранности, однако характер этих двух показателей остался схожим. Так, ЖС, рассчитанная по формуле (2), составляла $6\pm 1\%$ после криоконсервирования без криопротектора. При добавлении 2% ДМСО в среду криоконсервирования она увеличивалась до $15\pm 2\%$. После повышения концентрации ДМСО максимальная жизнеспособность КЭП ($53\pm 4\%$) была достигнута при 10% ДМСО (табл.2). Декстран, используемый как криозащитное вещество, не улучшал жизнеспособность КЭП и в некоторых случаях даже уменьшал его показатели. Добавление ПЭО с различной молекулярной массой в среду криоконсервирования показало схожую динамику сохранности. Максимальной ЖС ($73\pm 11\%$) удалось добиться при использовании 6% ПЭО-8000 и 2% ДМСО. Добавление любых ПЭО к 5% ДМСО привело к достоверному, по отношению к 10% ДМСО, увеличению ЖС. После отмывки криопротектора наблюдалось незначительное снижение ЖС при всех используемых его сочетаниях (табл.2).

Таблица 2. Влияние высокомолекулярных полимеров на жизнеспособность КЭП человека до и после отмывки криопротекторов

Table 2. Effect of polymers with high molecular weight on HFLCs viability before and after washing-out of cryoprotectants

Полимеры Polymers	Жизнеспособность КЭП до отмывки, % FLCs viability before thawing, %			
	Концентрация ДМСО, % DMSO concentration, %			
	0	2	5	10
Контроль Control	6 ± 1	15 ± 2	20 ± 3	53 ± 4
Декстран Dextran	8 ± 1	9 ± 1	33 ± 4	
ЭСТ FCS	10 ± 2	21 ± 1	24 ± 4	57 ± 5
ПЭО – 1500 PEO – 1500	27 ± 1	44 ± 2	65 ± 8	
ПЭО – 3500 PEO – 3500	38 ± 4	63 ± 2	69 ± 4	
ПЭО – 8000 PEO – 8000	48 ± 9	73 ± 11	72 ± 9	
Полимеры Polymers	Жизнеспособность КЭП после отмывки, % FLCs viability after thawing, %			
	0	2	5	10
Контроль Control	4 ± 1	10 ± 1	15 ± 4	49 ± 3
Декстран Dextran	9 ± 2	6 ± 1	22 ± 4	
ЭСТ FCS	7 ± 1	13 ± 2	20 ± 5	52 ± 4
ПЭО – 1500 PEO – 1500	25 ± 2	38 ± 1	57 ± 4	
ПЭО – 3500 PEO – 3500	36 ± 2	55 ± 2	63 ± 5	
ПЭО – 8000 PEO – 8000	47 ± 6	66 ± 8	67 ± 7	

viability and in some cases even reduced its parameters. Adding of PEOs with various molecular masses into cryopreservation medium has shown the similar to survival dynamics. Maximum viability ($73\pm 11\%$) was received when using 6% PEO-8000 and 2% DMSO. Adding of any PEOs to 5% DMSO resulted in statistically true in respect of 10% DMSO increase of viability. After washing-out of cryoprotectant there was observed a slight reduction of viability under all used combinations (Table 2). The closest indices of viability and survival of human FLCs were obtained with PEO-8000.

Therefore later we have investigated the effect of its various concentrations on the survival and viability of human FLCs.

Fig. 1a shows that adding of 1% PEO-8000 to cryopreservation medium, non-containing DMSO, resulted in a slight (in 1.5 times) increase of FLCs

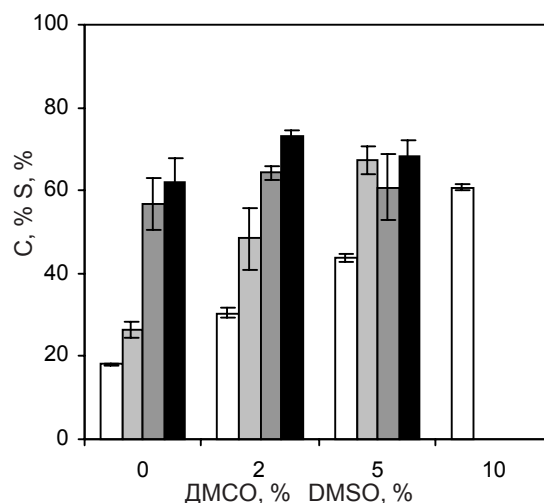
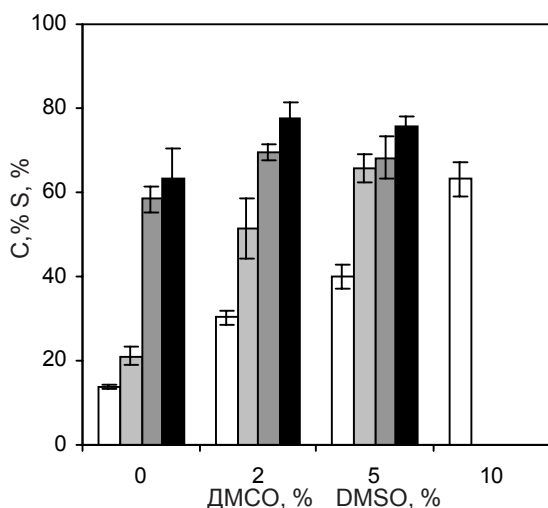


Рис 1. Влияние различных концентраций ПЭО-8000 на сохранность КЭП человека: до отмывки (а); после отмывки (б): □ – 0%; ■ – 1%; ■ – 3%; ■ – 6%.
Fig.1. Effect of different concentrations of PEO-8000 on HFLCs survival before washing-out (a); after washing-out (b): □ – 0%; ■ – 1%; ■ – 3%; ■ – 6%.

Самые близкие показатели ЖС и сохранности КЭП человека были получены с ПЭО-8000. Поэтому далее было исследовано влияние его различных концентраций на сохранность и жизнеспособность КЭП человека.

Из рис. 1,а видно, что добавление 1% ПЭО-8000 в среду криоконсервирования, не содержащую ДМСО, привело к незначительному (в 1,5 раза) повышению сохранности КЭП. Последующее добавление 2 и 5% ДМСО в среду криоконсервирования, содержащую 1% ПЭО-8000, увеличивало показатели сохранности в 2,5 и 3 раза и составляло 51 ± 7 и $66 \pm 3\%$ соответственно. Повышение концентрации ПЭО-8000 до 3% уже при нулевой концентрации ДМСО приводило к сохранению КЭП ($58 \pm 3\%$). Использование композиции, состоящей из 3% ПЭО-8000 и 2% ДМСО, способствовало увеличению показателя сохранности КЭП до $70 \pm 2\%$. Повышение концентрации ДМСО до 5% не улучшило сохранность КЭП после криоконсервирования (рис. 1,а). При использовании 6% ПЭО-8000 даже при нулевой концентрации ДМСО сохранность достоверно не отличалась от полученной при 10% ДМСО без полимера. Добавление 6% ПЭО-8000 в среду, содержащую 2% ДМСО, значительно увеличивало ($78 \pm 4\%$) сохранность КЭП, а отмывка от криопротектора не приводила к достоверному изменению сохранности КЭП (рис. 1,б).

Наилучшие показатели ЖС были получены при использовании сочетания 6% ПЭО-8000 с минимальной концентрацией ДМСО 2% и составляли $63 \pm 11\%$ (рис. 2). Эти показатели были выше, чем 10% ДМСО в присутствии эмбриональной сыворотки или без нее.

Хорошее криозащитное действие декстрана при криоконсервировании эритроцитов было отмечено в [9]. Однако декстран с молекулярной массой 100000

integrity. Following adding of 2 and 5% DMSO to cryopreservation medium, containing 1% PEO-8000, increased the indices of survival in 2.5 and 3 times and made 51 ± 5 and $66 \pm 3\%$, correspondingly. Increase in PEO-8000 concentration up to 3% even at zero concentration of DMSO resulted in the keeping of FLCs ($58 \pm 3\%$). Usage of the composition, containing of 3% PEO-8000 and 2% DMSO, contributed to the rise in FLCs survival up to $70 \pm 2\%$. An increase of DMSO concentration up to 5% did not improve the FLCs survival after cryopreservation (Fig.1,a). When using 6% PEO-8000 even at zero DMSO concentration the survival statistically did not differ from the obtained under 10% DMSO without polymer. Adding 6% PEO-8000 to the medium, containing 2% DMSO, significantly increased ($78 \pm 4\%$) of FLCs. Washing-out of cryoprotectant did not result to a statistical change in FLCs survival (Fig. 1,b).

The highest indices of viability were obtained when using in combination 6% PEO-8000 with minimum concentration of DMSO under 2% and made $63 \pm 11\%$ (Fig. 2). These parameters were higher than 10% DMSO in the presence of fetal calf serum and without it.

Good cryoprotective effect of dextran at cryopreservation was noted in the work [9]. However dextran with molecular mass of 100000 improved the indices neither survival nor human FLCs after cryopreservation with any DMSO concentrations.

At the same time PEOs with various molecular masses possess cryoprotective properties. Their application permitted to exclude embryonic serum out of cryopreservation medium as well as considerably reduce DMSO concentration. Maximum survival of human FLCs after cryopreservation was obtained using 6% PEO-8000 in combination

не улучшил показатели ни сохранности, ни КЭП человека после криоконсервирования ДМСО любых концентраций.

В то же время ПЭО с различными молекулярными массами обладают криозащитными свойствами. Их использование позволило исключить эмбриональную сыворотку из среды криоконсервирования, а также значительно снизить концентрацию ДМСО. Максимальная сохранность КЭП человека после криоконсервирования была получена с использованием 6% ПЭО-8000 в композиции с 2% ДМСО. Эти результаты были достоверно выше как по отношению к 10% ДМСО без полимера, так и по отношению к той же концентрации полимера без ДМСО. Было замечено улучшение показателей как сохранности, так и жизнеспособности КЭП при увеличении молекулярной массы ПЭО. Так, результаты ПЭО-1500 были ниже, чем ПЭО-3500, который в свою очередь оказывал более низкий криозащитный эффект, чем ПЭО-8000.

Известны работы, в которых различные ПЭО были успешно использованы как соединения, входящие в состав витрификационной среды для криоконсервирования различных клеток [7]. В [8] рассматривается совместное использование ПЭО и ДМСО для витрификации мышинных яйцеклеток, что способствовало значительному увеличению их ЖС. ПЭО обладает низкой токсичностью, его производные были использованы при разработке заменителей крови. Так, свободный и инкапсулированный в липосомы ПЭГ-модифицированный гемоглобин обладал слабым побочным эффектом [10,13]. Было установлено, что производные ПЭО существенно удлиняют время циркуляции в кровяном русле. Этот факт требует дальнейшего изучения, поскольку может явиться основой для разработки сред, препятствующих захвату печенью инфузировавшихся клеточных трансплантатов.

Использование ПЭО с высокой молекулярной массой для криоконсервирования КЭП может быть перспективным при создании среды криоконсервирования, свободной от токсичного ДМСО. Однако дальнейшее использование этих соединений в экспериментальной и клинической медицине требует изучения их влияния на функциональную активность КЭП.

Выводы

Таким образом, включение высокомолекулярных ПЭО в состав среды криоконсервирования снижает концентрацию ДМСО и исключает эмбриональную сыворотку. Криозащитная среда, содержащая 6% ПЭО-8000 и 2% ДМСО, позволяет максимально сохранить КЭП человека после криоконсервирования.

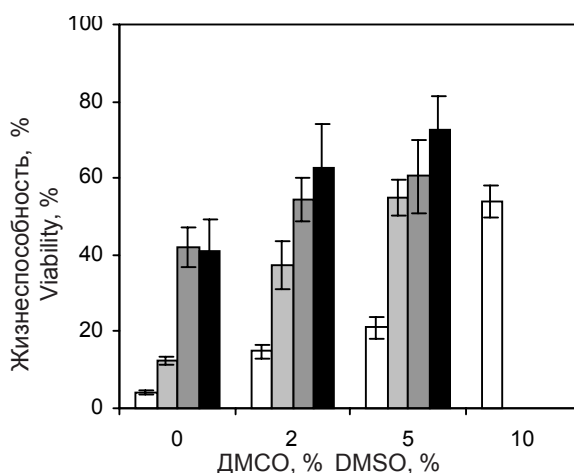


Рис. 2. Влияние различных концентраций ПЭО-8000 на жизнеспособность КЭП человека: до отмывки (а); после отмывки (б): □ – 0%; ■ – 1%; ■ – 3%; ■ – 6%.

Fig. 2. Effect of different concentrations of PEO-8000 on HELCs viability: before washing-out (a); after washing-out (b): □ – 0%; ■ – 1%; ■ – 3%; ■ – 6%.

with 2% DMSO. These results were statistically higher in comparison with both 10% DMSO without polymer and the same concentration of polymer without DMSO. There was been noted the improvement of indices of both survival and viability of FLCs with the rise in PEO molecular mass.

Thus the results on PEO-1500 were lower in comparison with PEO-3500 and that in its turn caused lower cryoprotective effect than PEO-8000.

There are available the papers where various PEOs were successfully used as the compounds, being the part of the vitrification medium for cryopreservation of different cells [7]. In the paper [8] the joint usage of PEO and DMSO for vitrification of murine oocytes was considered, that contributed to a considerable rise in their viability [11]. PEO has a low toxicity, its derivatives were used when developing blood substitutes. Thus, free and encapsulated to liposomes PEG-modified hemoglobin possessed a weak side effect [10, 13]. It has been established that PEO derivatives significantly prolong the circulation time in blood channel. This fact requires further studying, because it can be the base for elaboration of the media preventing the capture of infused cell transplants by liver.

The usage of PEO of high molecular weight for cryopreservation of FLCs may be perspective when creating the cryopreservation media free of toxic DMSO. However further application of these compounds in experimental and clinical medicine demands the studying their effect on functional activity of FLCs.

Conclusion

Thus the inclusion of high molecular weight PEO

Литература

1. Грищенко В.І., Петренко О.Ю., Снурніков О.С. Трансплантація кріоконсервованих клітинних суспензій ембріонів і плодів людини // Трансплантологія. – 2000. – 1, №1. – С.137-138.
2. Anderson E.M., Jones D.R.E., Liu D.T.Y., Evans A.A. Gestational age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal HPC preparations // Fetal Diagn. & Ther., 1996. – 11. – P. 427-432.
3. Bakaltcheva I., Ganong J.P., Holtz B.L., et al. Effects of high-molecular-weight cryoprotectants on platelets and the coagulation system // Cryobiology. – 2000. – Vol. 40. – P. 283-293.
4. Flake A.W., Harrison M.R., Scott Adzick N., Zanjani E.D. Transplantation of hematopoietic stem cells in utero the creation of hematopoietic chimeras // Science, 1986. – Vol. 233. – P. 776-778.
5. Horn E., Sputtek A., Standl T., Rudolf B., et al. Transfusion of autologous hydroxyethyl starch-cryopreserved red blood cells // Anesth. Analg. – 1997. – Vol. 85(4). – P. 739-745.
6. Jiun Zhao, Hsiao-Nan Hao, Ronald 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.
7. Ohboshi S., Fujihara N., Yoshida T. et al. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts // Animal Reproduction Sci. – 1997. – Vol. 48(1). – P. 27-36.
8. O'Neil L., Paytner S.J., Fuller B.J. Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution // Cryobiology. – 1998. – Vol. 34(3). – P. 295-301.
9. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35(2). – P. 173-186.
10. Phillips W., Klipper R., Awasthi V. et al. Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: A long circulating red cell substitute // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1999. – Vol. 288(2). – P. 665-670.
11. Smillie J., Munro A., Wood G., Mitchell R. Cryopreservation of human platelets with polyvinylpyrrolidone // Transfusion. – 1981. – Vol. 21(5). – P. 552-556.
12. Touraine J.L., Raudrant D., Royo C. et al. In utero transplantation of hematopoietic stem cells in humans Transplant Proc 1991, 23. – P. 1706-1708.
13. Winslow R., Gonzales A., Gonzales M. et al. Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes in a rat hemorrhage model // J. Appl. Physiol. – 1998. – Vol. 85(3). – P. 993-1003.

Поступила 18.07.2003

into the composition of cryopreservation medium reduces the DMSO concentration and excludes an embryonic serum.

Cryoprotective medium, containing 6% PEO-8000 and 2% DMSO, allows the maximum preserving of HFLCs after cryopreservation.

References

1. Grischenko V.I., Petrenko A.Yu., Snurnikov A.S. Transplantation of cryopreserved cellular suspensions of human embryos and fetuses // Trasplantatologiya. – 2000. – Vol. 1, №1. – С.137-138.
2. Anderson E.M., Jones D.R.E., Liu D.T.Y., Evans A.A. Gestational age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal HPC preparations // Fetal Diagn. & Ther., 1996. – 11. – P. 427-432.
3. Bakaltcheva I., Ganong J.P., Holtz B.L., et al. Effects of high-molecular-weight cryoprotectants on platelets and the coagulation system // Cryobiology. – 2000. – Vol. 40. – P. 283-293.
4. Flake A.W., Harrison M.R., Scott Adzick N., Zanjani E.D. Transplantation of hematopoietic stem cells in utero the creation of hematopoietic chimeras // Science, 1986. – Vol. 233. – P. 776-778.
5. Horn E., Sputtek A., Standl T., Rudolf B., et al. Transfusion of autologous hydroxyethyl starch-cryopreserved red blood cells // Anesth. Analg. – 1997. – Vol. 85(4). – P. 739-745.
6. Jiun Zhao, Hsiao-Nan Hao, Ronald 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.
7. Ohboshi S., Fujihara N., Yoshida T. et al. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts // Animal Reproduction Sci. – 1997. – Vol. 48(1). – P. 27-36.
8. O'Neil L., Paytner S.J., Fuller B.J. Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution // Cryobiology. – 1998. – Vol. 34(3). – P. 295-301.
9. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35(2). – P. 173-186.
10. Phillips W., Klipper R., Awasthi V. et al. Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: A long circulating red cell substitute // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1999. – Vol. 288(2). – P. 665-670.
11. Smillie J., Munro A., Wood G., Mitchell R. Cryopreservation of human platelets with polyvinylpyrrolidone // Transfusion. – 1981. – Vol. 21(5). – P. 552-556.
12. Touraine J.L., Raudrant D., Royo C. et al. In utero transplantation of hematopoietic stem cells in humans Transplant Proc 1991, 23. – P. 1706-1708.
13. Winslow R., Gonzales A., Gonzales M. et al. Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes in a rat hemorrhage model // J. Appl. Physiol. – 1998. – Vol. 85(3). – P. 993-1003.

Accepted in 18.07.2003