

## Влияние различных режимов криоконсервирования на сохранность стволовых кроветворных клеток костного мозга животных с аутоиммунными заболеваниями

Часть 2. Оценка *in vivo* функционального статуса кроветворных предшественников криоконсервированного костного мозга

UDC 615.018.41.014.41:616.72-002.77

A.N. GOLTSEV<sup>1\*</sup>, T.G. DUBRAVA<sup>1</sup>, YU.A. KOZLOVA<sup>1</sup>, M.V. OSTANKOV<sup>1</sup>, T.M. GURINA<sup>1</sup>, A.M. KUROY<sup>2</sup>

## Effect of Different Cryopreservation Regimens on Bone Marrow Hemopoietic Stem Cell Integrity in Animals With Autoimmune Diseases

Part 2. *In vivo* Estimation of Functional Status of Cryopreserved Bone Marrow Hemopoietic Progenitors

В сравнительном аспекте определены функциональные характеристики в системе *in vivo* стволовых кроветворных клеток костного мозга здоровых животных и с аутоиммунными заболеваниями до и после криоконсервирования в различных режимах. Показаны принципиальные различия исходного функционального статуса кроветворных предшественников здоровых доноров и с аутоиммунными заболеваниями, а также его изменения при аналогичных условиях криоконсервирования. Отмечено, что “оптимум” колониеобразующей активности КОЕс здоровых животных и с адьювантным артритом реализуется при криоконсервировании костного мозга в различных режимах.

**Ключевые слова:** костный мозг, кроветворные предшественники (КОЕ-ГМ, КОЕс), аутоиммунные заболевания, адьювантный артрит, криоконсервирование.

У порівняльному аспекті визначено функціональні характеристики в системі *in vivo* стовбурових кроветворних клітин кісткового мозку здорових тварин і з аутоімунними захворюваннями до і після криоконсервування в різних режимах. Показано принципові відмінності вихідного функціонального статусу кроветворних попередників здорових донорів і з аутоімунними захворюваннями, а також його зміни при аналогічних умовах криоконсервування. Зазначено, що „оптимум” колонієутворюючої активності КУОс здорових тварин і з ад’ювантним артритом реалізується при криоконсервуванні кісткового мозку у різних режимах.

**Ключові слова:** кістковий мозок, кроветворні попередники (КУО-ГМ, КУОс), аутоімунні захворювання, ад’ювантний артрит, криоконсервування.

Functional characteristics of bone marrow hemopoietic stem cells of healthy animals and with autoimmune diseases before and after cryopreservation with different regimens have been comparatively determined *in vivo*. The principle differences between an initial functional status of hemopoietic precursors of healthy donors and with autoimmune diseases, as well as its changes under similar cryopreservation conditions have been demonstrated. The “optimum” of CFUs colony-forming activity of healthy animals and those with adjuvant arthritis was noted as realised under bone marrow cryopreservation with different regimens.

**Key-words:** bone marrow, hemopoietic progenitors (GM-CFU, CFUs), autoimmune diseases, adjuvant arthritis, cryopreservation.

Долгосрочное хранение гемопоэтической ткани при сверхнизких температурах стало неотъемлемой частью многоступенчатого технологического процесса ее применения в клинической практике [2, 11, 15, 28]. Криоконсервированию могут подвергаться кроветворные клетки как здоровых доноров (заготовка материала, так называемых групп риска), так и полученные в силу “востребованности” от больного с той или иной патологией. К патологиям, для лечения которых применяется трансплантация костного мозга (КМ), относятся

A long-term storage of hemopoietic tissue under ultralow temperatures became an integral part of multistep technological process of its application into clinical practice [2, 11, 15, 28]. Either hemopoietic cells of healthy donors (material procurement from so-called risk groups) or obtained due to “demand” from a patient with that or this pathology may be cryopreserved. Among the pathologies, treated with bone marrow (BM) transplantation are autoimmune diseases (AID) [14, 24, 25]. A distinct mechanism of therapeutic effect of autologous hemopoietic tissue

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Институт медицинской радиологии АМН Украины им. С.П. Григорьева, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-39, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryopato@rambler.ru

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Medical Radiology named after S.P. Grigoryev of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3039, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryopato@rambler.ru

аутоиммунные заболевания (АИЗ) [14, 24, 25]. Точный механизм терапевтического эффекта от пересадки аутологичной гемопоэтической ткани больным с АИЗ остаётся неясным. Предполагается [13, 28], что при повторном прохождении через тимус вновь введенные аутологичные стволовые кроветворные клетки (СКК) и формирующиеся из них иммунокомпетентные клетки могут подвергаться “реставрации”, обеспечивая санацию и реконструкцию нормальной иммунной системы. Было показано, что проведение курсов иммуносупрессии (высокие дозы цитостатиков, тотальное облучение лимфоцитов) с последующей трансплантацией клеток КМ или СКК периферической крови приводит к положительному эффекту при лечении АИЗ [18, 29].

Использование КМ как корректора многих патологических состояний обусловлено многогранностью его свойств, прежде всего, наличием в нем стволовых клеток разного уровня организации: от предшественников гемопоэтического плацдарма до тотипотентных стволовых клеток мезенхимального происхождения [16, 30]. Известно, что в компартменте СКК костного мозга содержатся предшественники разной степени дифференцировки. Так, клетки, формирующие колонии *in vitro*, в частности КОЕ-ГМ, более дифференцированы в сравнении с клетками, формирующими колонии *in vivo* (КОЕс) [17, 30]. Каждая популяция также может быть разделена на субпопуляции в зависимости от степени их потенции. Считается, что КОЕ-ГМ, формирующие колонии, менее дифференцированы, чем формирующие кластеры [1]. Аналогично среди КОЕс более потенциальными являются клетки, формирующие колонии на 14-15-е сутки, чем на 7-8-е [16, 21]. В общем можно согласиться, что в этом ряду каждая более дифференцированная форма предшественников формируется из предыдущего клона. Эффективность применения криоконсервированного КМ как раз и зависит от характера изменений структурно-функциональной организации (от стойких повреждений до транзиторно развивающихся изменений) и степени восстановления исходных свойств миелокариоцитов разного уровня дифференцировки. В работе [6] показаны принципиальные различия изменения функционального статуса кроветворных предшественников здоровых доноров и с АИЗ при аналогичных изменениях условий криоконсервирования в системе *in vitro*. Не менее важной задачей является оценка состояния более потенциальных кроветворных предшественников КМ животных с АИЗ, формирующих колонии в системе *in vivo*, и их ответ на действие факторов криоконсервирования.

Цель работы – изучить в сравнительном аспекте особенности влияния различных режимов криоконсервирования на колониобразующую актив-

engrafting to AID patients has remained unclear. As assumed [13, 28], during a repeated passing via thymus the newly introduced autologous hemopoietic stem cells (HSC) and forming from them immune competent cells may be subjected to a “restoration”, thereby providing the normal immune system sanitation and reconstruction. The immune suppression performance (high doses of cytostatics, total lymphocyte radiation) with following BM cells and peripheral blood HSC transplantation were shown to result in a positive effect during AID treatment [18, 29].

Use of BM as a corrector in many pathological states is stipulated by its versatile properties, primarily, by presence of stem cells with different organisation level: from hemopoietic progenitors to the totipotent stem cells of mesenchymal origin [16, 30]. The bone marrow HSC compartment is known to comprise progenitors of various differentiation extents. Thus, the colony-forming cells *in vitro*, in particular CFU-GM, are more differentiated compared to the colony-forming ones *in vivo* (CFUs) [17, 30]. Each population may be divided into subpopulations depending on their potency extent. Colony-forming CFU-GM are considered to be less differentiated than cluster-forming ones [1]. Similarly, among CFUs the more potent cells are those, forming colonies to the 14<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> days than to the 7<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> ones [16, 21]. Generally, we can admit the fact that in these series each more differentiated progenitor form is developed from a previous clone. The efficiency of cryopreserved BM application depends just on a character of changes in structural and functional organisation (from stable damages to transitionally developing changes) and the recovery extent of initial properties of myelokaryocytes of different organisation level. The principle differences of a change in hemopoietic progenitor functional status of healthy and AID donors under similar changes in cryopreservation conditions *in vitro* are demonstrated in the paper [6]. To evaluate the state of more potent BM hemopoietic progenitors in AID animals, forming colonies *in vivo* and their response to cryopreservation effect is not less important task.

The research was aimed to comparatively study the peculiarities of the influence of different cryopreservation regimens on colony-forming activity of different extent of bone marrow HSC differentiation in adjuvant arthritis animals *in vivo*.

### Materials and methods

Experiments were carried-out in 4 month-old CBA/CaLaC male mice of 20-25 g according to the statements of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985).

Bone marrow cells of animals with AA, induced by subplantar introduction of complete Freund’s adjuvant served as the research object [23]. Methodical

ность разной степени дифференцировки СКК костного мозга животных с адьювантным артритом (АА) в системе *in vivo*.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на мышах-самцах линии СВА/СaLac 4-месячного возраста массой 20-25 г в соответствии с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Объектом исследования были клетки КМ животных с АА, который индуцировали субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда [23]. Методические подходы по криоконсервированию КМ представлены в [6].

Количество кроветворных предшественников в КМ, формирующих колонии в селезенках летально облученных мышей (КОЕс), определяли общепринятым методом [27]. Суспензию КМ (нативного и криоконсервированного) вводили в хвостовую вену летально облученным реципиентам в дозе  $1,0 \times 10^5$  клеток. Мышей-реципиентов облучали на установке РУМ-17 (Россия, Мосрентген) в дозе 8,5 Гр.

Учет колоний проводили на 8-е (КОЕс-8) и 14-е (КОЕс-14) сутки после введения КМ. Для оценки распределения в КМ кроветворных клеток с различной степенью дифференцировки (более дифференцированными предшественниками являются КОЕс-8, менее – КОЕс-14) [16, 21] был введен индекс пролиферативной активности ИПА КОЕс, представляющий собой отношение КОЕс-14 к КОЕс-8.

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

*Оценка in vivo функционального статуса кроветворных предшественников криоконсервированного КМ здоровых животных.* После замораживания КМ здоровых животных в режиме 1 (P1) и последующего отогрева лучшие результаты сохранности КОЕс, как и КОЕс-ГМ, были получены при использовании 10%-го ДМСО (рис. 1, а). При этом как 7, так и 10%-е концентрации ДМСО в большей степени обеспечивали сохранность КОЕс-14.

В режиме 2 (P2) (рис. 1, б) сохранность КОЕс-8 снижалась в 2 и 1,5 раза по сравнению с режимом 1 при использовании 7 и 10%-го ДМСО соответственно. Однако при режиме 2 прослеживалась более высокая, чем при режиме 1, сохранность КОЕс-14 под защитой 7%-го ДМСО. О выраженных перераспределениях субпопуляций КОЕс свидетельствует и значительное изменение ИПА в сравнении с показателем нативного КМ.

approaches on BM cryopreservation are presented in the paper [6].

An amount of hemopoietic progenitors in BM, which form colonies in spleen of lethally irradiated mice (CFUs) was determined by the standard method [27]. BM suspension (native and cryopreserved ones) was introduced into a tail vein to lethally irradiated recipients in  $1.0 \times 10^5$  cell dose. Recipient mice were irradiated with RUM-17 device (Mosrentgen, Russia) in 8.5 Gy dose.

Colonies were calculated to the 8<sup>th</sup> (CFUs-8) and 14<sup>th</sup> (CFUs-14) days after BM introduction. In order to evaluate hemopoietic cell distribution in BM with various differentiation extent (more differentiated progenitors are CFUs-8, less ones are CFUs-14) [16, 21] the index of proliferative activity (CFUs IPA) representing the ratio of CFUs-14 to CFUs-8, was introduced.

Data were statistically processed using Student's t-criterion.

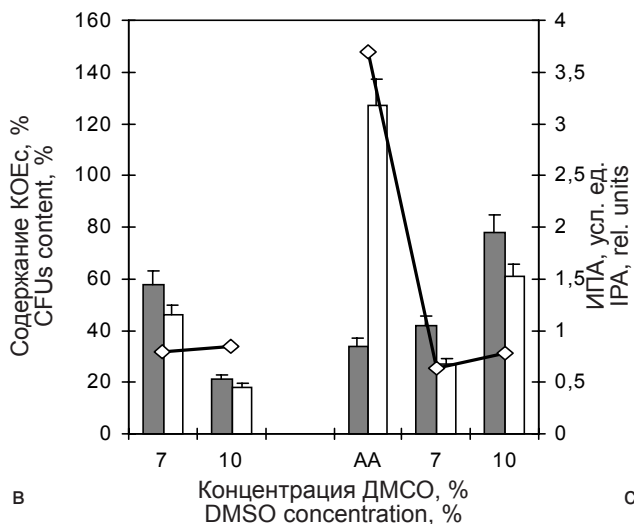
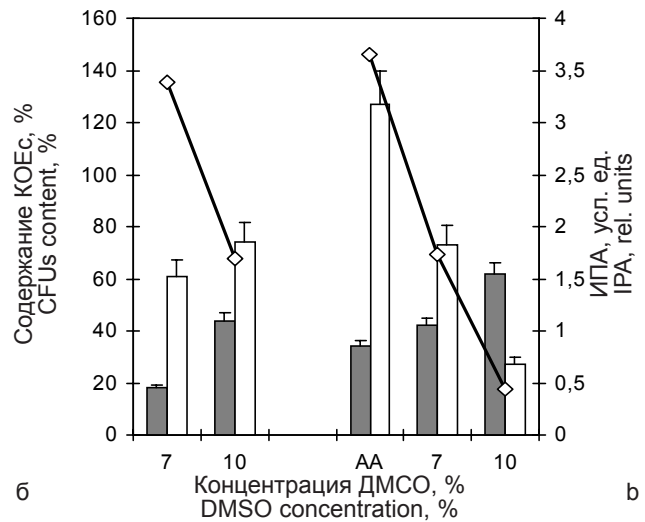
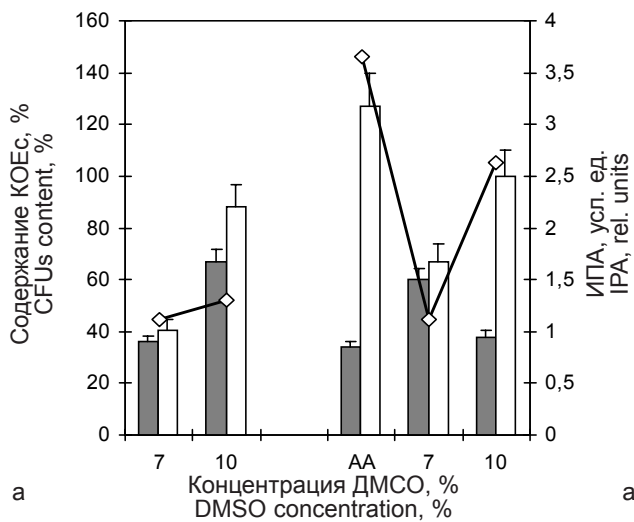
### Results and discussion

*In vivo estimation of functional status of hemopoietic progenitors in cryopreserved healthy animal BM.* After healthy animal BM freezing with regimen 1 and following thawing the highest results for both CFUs and GM-CFU integrity were obtained when using 10% DMSO (Fig. 1, a). At the same time both 7 and 10% DMSO concentrations provide in a greater extent the CFUs-14 integrity.

With regimen 2 (Fig. 1, b) the CFUs-8 integrity reduced in 2 and 1.5 times compared to the regimen 1 when using 7 and 10% DMSO correspondingly. However a higher CFUs-14 integrity under 7% DMSO protection was observed with regimen 2 compared to regimen 1. Manifested redistributions of CFUs subpopulations are testified by a significant IPA change compared to the native BM indices.

Increase in cooling rate up to 40°C/min (regimen 3) affected the integrity of CFUs subpopulations (Fig. 1, c). Similarly to GM-CFU the more potent CFUs-14 were labile to the effect of cryopreservation factors realised with this regimen and both cryoprotectant concentrations. Thus, when using 7% DMSO the amount of CFUs-14 and CFUs-8 reduced in 2.2 and 1.7 times, respectively, compared to the index before cryopreservation. Increase in cryoprotectant concentration up to 10% minimised their integrity approximately down to 20%.

*In vivo estimation of functional status of cryopreserved BM hemopoietic progenitors in AA animals.* Bone marrow of AA animals by the CFUs-8 and CFUs-14 content significantly differed from healthy animal BM (Fig. 1). It is incredible, but at the background of 1.3-fold increase in progenitor content with high proliferative potential (CFUs-14) there was



**Рис. 1.** Содержание КОЕс в КМ, криоконсервированном со следующими скоростями охлаждения, °С/мин: а – 1 (режим 1); б – 10 (режим 2); в – 40 (режим 3); ■ – на 8-е сутки; □ – на 14-е сутки; — – ИПА КОЕс. За 100% принято количество колоний, формируемых нативным КМ здоровых животных, ИПА нативного КМ здоровых животных – 1.

**Fig. 1.** CFUs content in BM, cryopreserved with following cooling rates, °C/min: a – 1 (regimen 1); б – 10 (regimen 2); с – 40 (regimen 3); ■ – the 8<sup>th</sup> day; □ – the 14<sup>th</sup> day; — – IPA of CFUs. The number of colonies, formed by healthy animal native BM was assumed as 100%, IPA of healthy animal native BM – 1.

Увеличение скорости охлаждения до 40°C/мин (режим 3 (P3)) отражалось на сохранности субпопуляций КОЕс (рис. 1, в). Подобно КОЕс-ГМ, лабильными к действию реализуемых при этом режиме и обеих концентрациях криопротектора факторов криоконсервирования были более потенциальные КОЕс-14. Так, при использовании 7%-го ДМСО количество КОЕс-14 снижалось в 2,2 раза, а КОЕс-8 – в 1,7 раза в сравнении с показателем до криоконсервирования. Повышение концентрации криопротектора до 10% минимизировало их сохранность примерно до 20%.

*Оценка in vivo функционального статуса кроветворных предшественников криоконсервированного КМ животных с АА.* Костный мозг животных с АА по содержанию КОЕс-8 и КОЕс-14 существенно отличался от КМ здоровых животных (рис. 1). Парадоксально, но на фоне увеличения в 1,3 раза содержания предшественников с большим пролиферативным потенциалом (КОЕс-14) отмечалось снижение почти в 2,5 раза количества более дифференцированных (КОЕс-8). О перераспределении в КМ животных с АА кроветворных пред-

observed an almost 2.5 times decrease in the amount of more differentiated ones (CFUs-8). CFUs IPA increase up to  $3.65 \pm 0.19$  rel. units ( $1.0 \pm 0.05$  rel. units in healthy animals) testifies to a redistribution in AA animals' BM of hemopoietic progenitors towards an increase in more potent ones.

Response of AA animal BM CFUs to cryopreservation factors was also specific. Thus, with regimen 1 the CFUs-8 colony-forming potential, similar to that before cryopreservation, was provided by DMSO in 10% concentration (Fig. 1, a). At the same time the CFUs-14 content although being by some 30% lower, than before freezing, but did not reduce lower than the BM indices of healthy animals and the CFUs IPA remained more than in 2.5 times higher. Maximally balanced ratio of both progenitor subpopulations was noted after BM cryopreservation with 1°C/min rate with 7% DMSO. In this case after BM introduction the capability to form colonies was preserved from 60 to 67% CFUs-8 and CFUs-14. Namely this cryopreservation regimen "harmonises" a colony-forming BM potential of AA animals (CFUs IPA) and approached it to the indices of healthy animal BM ( $1.12 \pm 0.02$  and  $1.2 \pm 0.01$ , correspondingly), cryopreserved under 10% DMSO.

Functional potential of bone marrow CFUs, cryopreserved with regimen 2 (Fig. 1, b) was much dependent on cryoprotectant concentration as well. Thus,

шествеников в сторону повышения более потенциальных свидетельствует повышение ИПА КОЕс до  $3,65 \pm 0,19$  усл. ед. (у здоровых животных –  $1,0 \pm 0,05$  усл. ед.).

По-особому отвечали КОЕс костного мозга животных с АА и на факторы криоконсервирования. Так, при режиме 1 колониеобразующий потенциал КОЕс-8, аналогичный тому, который был до криоконсервирования, обеспечивал ДМСО в концентрации 10% (рис. 1, а). В то же время содержание КОЕс-14, хотя и было примерно на 30% ниже, чем до замораживания, но все же не опускалось ниже показателя КМ здоровых животных и более чем в 2,5 раза выше контроля оставался ИПА КОЕс. Максимально сбалансированное соотношение обеих субпопуляций предшественников отмечалось после криоконсервирования КМ со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  с 7%-м ДМСО. В этом случае после введения КМ от 60 до 67% КОЕс-8 и КОЕс-14 сохраняли способность формировать колонии. Именно этот режим криоконсервирования “гармонизировал” колониеобразующий потенциал КМ животных с АА (ИПА КОЕс) и приближал его к показателям КМ здоровых животных ( $1,12 \pm 0,02$  и  $1,3 \pm 0,01$  соответственно), криоконсервированного под защитой 10%-го ДМСО.

Функциональный потенциал КОЕс КМ, криоконсервированного в режиме 2 (рис. 1, б), также существенно зависел от концентрации криопротектора. Так, при увеличении концентрации ДМСО до 10% происходило перераспределение субпопуляций кроветворных клеток с существенным преобладанием менее потенциальных КОЕс-8. Их количество увеличивалось в 1,8 раза, а КОЕс-14 снижалось почти в 5 раз по сравнению с количеством до криоконсервирования, что сопровождалось снижением ИПА до 0,44 усл. ед. Однако при снижении концентрации ДМСО до 7%, как и при режиме 1, наблюдалась тенденция к изменению ИПА КОЕс до уровня криоконсервированного КМ здоровых животных с 10%-м ДМСО. Итак, сочетание медленных скоростей охлаждения (10 или  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) с 7%-м ДМСО сопровождается как бы эффектом “реставрации” функционального потенциала КОЕс в КМ, модифицированном развивающейся патологией.

Быстрое замораживание КМ животных с АА ( $40^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) при 7 и 10%-х концентрациях криопротектора в большей степени ингибировало функцию КОЕс-14 (рис. 1, в). Однако в данном случае в противоположность КМ здоровых животных при повышении концентрации криопротектора количество КОЕс-8 и КОЕс-14 увеличивалось почти в два раза. Важно также, что только при этой скорости замораживания 10%-я концентрация ДМСО в наименьшей степени по сравнению с другими

with DMSO concentration increase up to 10% a redistribution of hemopoietic cell subpopulation with a considerable predomination of less potent CFUs-8 occurred. Their amount increased in 1.8 times and CFUs-14 reduced almost in 5 times compared to the amount before cryopreservation, that was accompanied with IPA decrease down to 0.44 rel. units. However under DMSO concentration decrease down to 7%, as for regimen 1 too, a tendency to a change in CFUs IPA to the level of cryopreserved BM of healthy animals with 10% DMSO was observed. Thus, combining slow cooling rates (10 or  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ ) with 7% DMSO is accompanied with a kind of “restoration” effect of CFUs functional potential in BM, modified by developing pathology.

Rapid freezing of AA animal BM ( $40^\circ\text{C}/\text{min}$ ) under 7 and 10% cryoprotectant concentrations inhibited in a greater extent CFUs-14 function (Fig. 1, c). However, in this case in contrast to healthy animal BM when increasing cryoprotectant concentration the CFUs-8 and CFUs-14 amount augmented almost twice. Of importance is also the fact that only under this freezing rate a 10% DMSO concentration the in the least extent compared to other rates caused the IPA deviation from the control ( $0.02 \pm 0.001$ ).

*In vivo estimation of modification extent of BM functional status using an integral index of summary deviation extent (SDE).* For healthy animal bone marrow CFUs the lowest change in SDE index (CFUs-8+CFUs-14+CFUs IPA) and the highest results ( $0.48 \pm 0.02$ ) were observed when using regimen 1 and 10% DMSO (Table). For regimen 2 the SDE index was better but twice inferior to the index of regimen 1 under 10% DMSO concentration ( $0.99 \pm 0.04$ ) as well. SDE was at the same level with regimen 3 but even with 7% DMSO concentration.

SDE changed differently for CFUs of AA animal bone marrow: in contrast to healthy animal BM for regimen 1 and 2 a more satisfactory was 7% cryoprotectant concentration but not 10% one and for regimen 3 it was a 10% one, moreover this result ( $0.63 \pm 0.03$ ) was better for BM of animals with pathology (Table). It is surprising, but SDE dispersion in studied indices under different regimens and cryoprotectant concentrations was lower for BM of AA animals (0.63-1.35) than for healthy animal BM (0.48-1.64). This is testified by the results presented in Fig. 2.

Summary deviation extent in all indices has also confirmed that for healthy animal BM the maximum integrity and harmonic ratio of hemopoietic progenitors of various differentiation level (clusters, colonies, CFUs-8, CFUs-14) were provided by slow freezing rate and 10% DMSO concentration ( $0.56 \pm 0.02$ ) (Table). Under the same cryoprotectant concentration a 10-fold freezing rate increase caused more than 2-

скоростями вызывала отклонение ИПА от контроля ( $0,02 \pm 0,001$ ).

Оценка степени модификации функционального статуса *in vivo* КМ с помощью интегрального показателя суммарной степени отклонения (ССО). Для КОЕс костного мозга здоровых животных наименьшее изменение показателя ССО (КОЕс-8+КОЕс-14+ИПА КОЕс) и наилучшие результаты ( $0,48 \pm 0,02$ ) отмечены при использовании режима 1 и 10%-го ДМСО (таблица). Для режима 2 показатель ССО был лучшим, хотя и в два раза уступал показателю режима 1 также при концентрации 10%-го ДМСО ( $0,99 \pm 0,04$ ). На таком же уровне была ССО при режиме 3, но уже при 7%-й концентрации ДМСО.

По-иному изменялась ССО для КОЕс костного мозга животных с АА: в отличие от КМ здоровых животных для режимов 1 и 2 более удовлетворительной была не 10, а 7%-я концентрация криопротектора, а для режима 3 – 10%-я, причем этот результат ( $0,63 \pm 0,03$ ) был лучшим для КМ животных с патологией (таблица). Удивительно, но дисперсия ССО исследуемых показателей при разных режимах и концентрациях криопротектора была меньше для КМ животных с АА ( $0,63-1,35$ ), чем для КМ здоровых животных ( $0,48-1,64$ ), об этом свидетельствуют результаты, представленные на рис. 2.

Сравнение показателей ССО также показало, что для КМ здоровых животных максимальную сохранность и гармоничное соотношение кроветворных предшественников разного уровня дифференцировки (кластеров, колоний, КОЕс-8, КОЕс-14) обеспечивали медленная скорость замораживания и 10%-я концентрация ДМСО ( $0,56 \pm 0,02$ ) (таблица). При этой же концентрации криопротектора увеличение скорости охлаждения в 10 раз вызывало более чем 2-кратное, а в 40 раз – 4-кратное ухудшение показателя ССО. Однако, при использовании 7%-го ДМСО суммарная степень отклонения в два раза уступала лучшему результату ( $1,25 \pm 0,06$  и  $0,56 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ).

Более удовлетворительные результаты реализации функционального статуса для предшественников криоконсервированного КМ животных с АА при медленной скорости (режимы 1 и 2) получены с 7%-м ДМСО, а при быстрой – с 10%-м ДМСО. При этом надо отметить, что это был лучший результат ССО для КМ животных с АА, хотя он в два раза уступал лучшему результату ССО для КМ здоровых животных ( $1,18 \pm 0,06$  и  $0,56 \pm 0,02$  соответственно,  $p < 0,05$ ).

В клинической практике одним из важнейших этапов трансплантации КМ является его хранение с применением тех или иных технологий криокон-

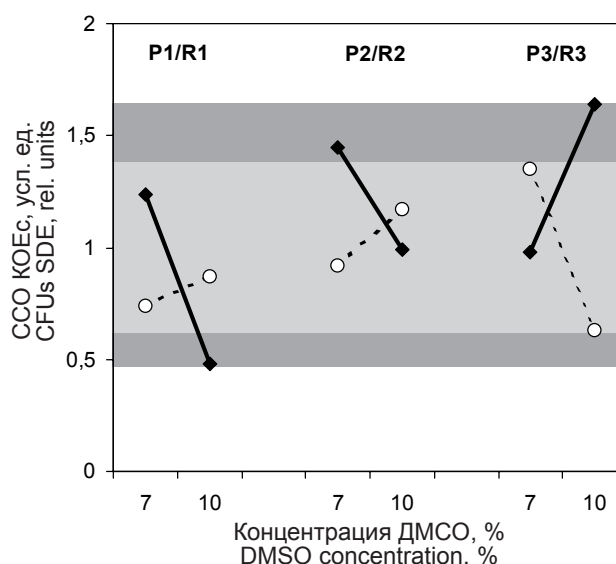
fold SDE index worsening and a 40-fold increase did a 4-fold one. However when using 7% DMSO the SDE was twice inferior to the highest result ( $1.25 \pm 0.06$  and  $0.56 \pm 0.02$ ,  $p < 0.05$ ).

More satisfactory results of functional status realisation for cryopreserved BM progenitors of AA animals at a slow rate (regimens 1 and 2) were obtained with 7% DMSO but with a rapid one it was done with 10% DMSO. At the same time of note is the fact that it was the best SDE result for AA animal BM, although it was twice inferior to the best SDE result for healthy animal BM ( $1.18 \pm 0.06$  and  $0.56 \pm 0.02$ , correspondingly,  $p < 0.05$ ).

In clinical practice one of the important stages of BM transplantation is its storage with applying one or another cryopreservation technologies [2, 7, 8]. The main damages of cell structures are directly or indirectly associated to crystallisation processes, which character is determined by cryoprotectant concentration and cooling rate. Nowadays one admits the following grades of cooling rates: slow  $1-10^\circ\text{C}/\text{min}$ , rapid  $10-5000^\circ\text{C}/\text{min}$  ones [2], moreover among these rates for BM cell cryopreservation the most “demanded” are the slow ones [6, 11, 24].

When realising any cooling rates there are differences in the action of physical and chemical cryopreservation factors, determined by either freezing parameters or initial object status [2, 5, 10].

From the points of theoretic concepts and the applied cryobiological aspects of great importance in deter-



**Рис. 2.** Суммарная степень отклонения показателей КОЕс-8, КОЕс-14 и ИПА КОЕс криоконсервированного КМ в зависимости от режима замораживания: сплошная линия – здоровые животные; пунктирная – животные с АА.

**Fig. 2.** Summary deviation extent of CFUs-8, CFUs-14 indices and CFUs IPA of cryopreserved BM depending on freezing regimen: solid line – healthy animals; dotted line – animals with AA.

Суммарная степень отклонения показателей функционального потенциала кровяных клеток КМ после криоконсервирования с различными концентрациями ДМСО и скоростями охлаждения

Summary deviation extent of functional potential indices of BM hemopoietic cells after cryopreservation with different DMSO concentrations and cooling rates

Показатель Index	Группа Group	Режим 1 (1°C/мин) Regimen 1 (1°C/min)					Режим 2 (10°C/мин) Regimen 2 (10°C/min)					Режим 3 (40°C/мин) Regimen 3 (40°C/min)				
		5	7	10	5	7	10	5	7	10	5	7	10	5	7	10
КОЕс-8 CFUs-8	1 Здоровые животные Healthy animals	–	0,64±0,03	0,33±0,01	–	0,820±0,004#	0,56±0,03#	–	–	–	–	–	–	–	0,42±0,02#	0,82±0,04#
	2 АА АА	–	0,40±0,02*	0,67±0,02*	–	0,58±0,02*#	0,38±0,01*#	–	–	–	–	–	–	–	0,58±0,03*#	0,22±0,01*#
КОЕс-14 CFUs-14	3 Здоровые животные Healthy animals	–	0,59±0,03	0,12±0,007	–	0,39±0,02#	0,36±0,02#	–	–	–	–	–	–	0,54±0,03	0,82±0,05#	
	4 АА АА	–	0,33±0,01*	0	–	0,27±0,01*	0,73±0,03*#	–	–	–	–	–	–	0,73±0,02*#	0,39±0,02*#	
ИПА КОЕс CFUs IPA	5 Здоровые животные Healthy animals	–	0,010±0,001	0,03±0,001	–	0,24±0,01#	0,070±0,002#	–	–	–	–	–	–	0,020±0,001	0	
	6 АА АА	–	0,010±0,001	0,20±0,01*	–	0,07±0,01*#	0,060±0,003#	–	–	–	–	–	–	0,040±0,002*#	0,020±0,001#	
ССО: Σ=КОЕс-8 + КОЕс-14+ИПА КОЕс SDE: Σ= CFUs-8+CFUs-14+ CFUs IPA	7 Здоровые животные Healthy animals	–	1,24±0,04	0,48±0,02	–	1,45±0,06#	0,99±0,04#	–	–	–	–	–	–	0,98±0,06	1,64±0,06*	
	8 АА АА	–	0,74±0,03*	0,87±0,04*	–	0,92±0,05#	1,17±0,08#	–	–	–	–	–	–	1,35±0,09#	0,63±0,03*#	
ССО: Σ=КОЕ-ГМ+ КОЕс-8+КОЕс-14 SDE: Σ= CFU-GM+CFUs-8+ CFUs-14	9 Здоровые животные Healthy animals	–	1,46±0,06	0,53±0,04	–	1,60±0,09	1,28±0,06#	–	–	–	–	–	–	1,20±0,06#	2,15±0,10*	
	10 АА АА	–	1,22±0,09*	1,26±0,06*	–	1,30±0,05*	1,67±0,08#	–	–	–	–	–	–	1,90±0,07*#	1,11±0,06*	
ССО: Σ=КОЕ-ГМ + ИПА КОЕ-ГМ SDE: Σ=CFU-GM + CFUs CFU-GM	11 Здоровые животные Healthy animals	0,44±0,02	0,32±0,03	0,080±0,005	0,60±0,03#	0,42±0,02#	0,39±0,02#	0,53±0,04	–	–	–	–	–	0,24±0,02	0,51±0,02#	
	12 АА АА	0,67±0,03*	0,55±0,04*	0,59±0,03*	0,65±0,04	0,52±0,05	0,64±0,03*	0,64±0,04	–	–	–	–	–	0,61±0,03*	0,55±0,02	
Итого: Σ=[КОЕ-ГМ + ИПА КОЕ-ГМ] + [КОЕс-8 + КОЕс-14 + ИПА КОЕс] Total: Σ=[CFU-GM + CFU-GM IPA] + [CFUs-8+CFUs-14 +CFUs IPA]	13 Здоровые животные Healthy animals	–	1,56±0,07	0,56±0,02	–	1,87±0,09	1,38±0,06#	–	–	–	–	–	–	1,25±0,06	2,19±0,10*	
	14 АА АА	–	1,29±0,06*	1,47±0,06*	–	1,44±0,07*	1,81±0,08*#	–	–	–	–	–	–	1,96±0,07*#	1,18±0,04*#	

Примечание: различия достоверны при p<0,05 по сравнению: \* – с контролем каждого показателя, # – режимом 1; затемненные ячейки – лучшие показатели ССО для каждого режима замораживания КМ.

Notes: differences are statistically significant at p<0.05 compared to: \* – the control of each index, # – regimen 1; shaded are the most demonstrative values of SDE for each BM freezing regimen.

сервирования [2, 7, 8]. Основные повреждения клеточных структур прямо или косвенно связаны с процессами кристаллизации, характер которых определяется концентрацией криопротектора и скоростью охлаждения. В настоящее время признаются следующие градации скоростей замораживания: медленные 1-10°C/мин, быстрые – 10-5000°C/мин [2], причем из этих скоростей для криоконсервирования клеток КМ наиболее “востребованными” являются медленные скорости [6, 11, 24].

При реализации любых скоростей охлаждения существуют различия в действии физико-химических факторов криоконсервирования, которые определяются как параметрами замораживания, так и исходным статусом объекта [2, 5, 10].

С позиций теоретических концепций и прикладных аспектов криобиологии существенную значимость в определении криолабильности (как и криостабильности) биообъекта имеет его исходное структурно-функциональное состояние [5, 10], позволяющее заключить, что “оптимальные” режимы криоконсервирования КМ здорового донора не могут быть таковыми для КМ донора с патологией. Для такого КМ нужны “адаптированные” программы криоконсервирования.

Особенности структурно-функциональной организации клеточно-тканевых субстратов КМ здоровых доноров и с АИЗ очевидны. Так, при изучении пунктатов КМ больных с аутоиммунной гемолитической анемией отмечено разной степени увеличение доли клеток в S-фазе и в G<sub>2</sub>+M-фазе и, как следствие, более чем 2-кратное увеличение показателя отношения S/(G<sub>2</sub>+M) по сравнению с его значением у здоровых людей [12], что рассматривается как следствие блока пролиферации клеток КМ в фазе синтеза ДНК. Нормальные СКК не способны пролиферировать *in vivo* при отличиях с микроокружением (стромой) по главному комплексу гистосовместимости, в то время как СКК животных с АИЗ – пролиферируют [19]. Приведенные в [6] результаты подчеркивают выраженные различия колониобразующего потенциала (КОЕ-ГМ) КМ животных с АИЗ, в частности с АА, для которых существует отличающийся от нормальных клеток принцип лиганд-рецепторных взаимодействий, определяемый, видимо, их внутренним состоянием и характеристиками мембранных структур.

Согласно существующим концепциям [16, 30], каждая более дифференцированная форма предшественников формируется из предыдущего клона (КОЕ-ГМ из КОЕс). С этих позиций установленное при АА снижение уровня содержания КОЕс-8 может обуславливать более низкий уровень формирующихся из них в дальнейшем КОЕ-ГМ. Хотя не исключено, что низкий их уровень, особен-

но, минимизируя биобъект cryolability (cryostability as well) is its initial structural and functional state [5, 10], enabling to conclude that the “optimal” cryopreservation regimens for healthy donor BM can not be those for BM of donor with pathology. For this BM the “adapted” cryopreservation programs are needed.

The peculiarities of structural and functional organisation of cellular and tissue substrates of healthy and AID donor BM are evident. Thus, when studying the BM punctates of patients with autoimmune hemolytic anemia there was noted a different cell part increase in S-phase and G<sub>2</sub>+M one and, consequently, more than a 20-fold increase in S/(G<sub>2</sub>+M) ratio index compared to its value in healthy people [12], that is considered as resulting in BM cell proliferation block in DNA synthesis phase. Normal HSC are not capable of *in vivo* proliferation if there is main histocompatibility complex difference with microenvironment (stroma), meanwhile the HSC of AID animals proliferate [19]. The shown results [6] emphasise the manifested differences of BM colony-forming potential (CFU-GM) of AID animals, in particular with AA, for those there is a principle of ligand-receptor interactions, differing from the normal cells, which is apparently determined by their internal state and membrane structure characteristics.

According to the existing concepts [16, 30] each more differentiated form of progenitors is formed from a previous clone (CFU-GM from CFUs). From this point an established decrease in CFUs-8 content level at AA may stipulate a lower level of next forming from them CFU-GM. Although their low level, especially clusters, is not excluded to result from an increased progenitor differentiation into mature blood elements, that is confirmed by an established fact of manifested leukocytosis development within this period (results are not shown).

Generally a lack in BM of the most differentiated hemopoietic progenitors by the feedback principle determines the need of progenitor redistribution in stem compartment. As a result there is an augmenting activity of self-reproduction of more potent CFUs-14, *i.e.* at the certain stages of AA development in hemopoietic sites the preconditions are formed and demanded compensatory mechanisms of less differentiated hemopoietic progenitors are realised. This redistribution can not be excluded as resulting from hemopoietic site response to organism cytokine profile, considerably changing under these pathologies. When estimating the content and functional state of myelokaryocytes in patient with rheumatoid arthritis there were established a low level of clonogenic recovery in BM long-term culture (BFU-E and CFU-GM) and a decrease in CD34<sup>+</sup> cell amount at the background of apoptotic cell number increase compared to the control [24]. In the paper [22] stromal cells of such BM are shown as



но кластеров, может быть следствием повышенной дифференцировки предшественников в зрелые элементы крови, что подтверждается установленным фактом развития выраженного лейкоцитоза в этот период (результаты не приводятся).

В целом недостаток в КМ наиболее дифференцированных кроветворных предшественников по принципу обратной связи определяет необходимость перераспределения предшественников в стволовом компартменте. Результатом является повышающаяся активность самовоспроизведения более потентных КОЕс-14, т.е. на определенных этапах развития АА в гемопоэтическом плацдарме создаются предпосылки и реализуются компенсаторные механизмы востребованности менее дифференцированных кроветворных предшественников. Нельзя исключить, что такое перераспределение является следствием ответа гемопоэтического плацдарма на существенно изменяющийся при такого рода патологиях цитокиновый профиль организма. При оценке содержания и функционального состояния миелокариоцитов пациентов с ревматоидным артритом установлены низкий уровень клоногенного восстановления в долгосрочной культуре КМ (БОЕ-Э и КОЕ-ГМ) и уменьшение количества CD34<sup>+</sup>-клеток на фоне увеличения их апоптоза по сравнению с контролем [24]. В работе [22] показано, что стромальные клетки такого КМ не способны поддерживать нормальный гемопоэз и продуцируют большое количество ФНО- $\alpha$ . Похоже, что этот цитокин через собственный рецептор (ФНО- $\alpha$ -р) индуцирует (опосредованно или непосредственно) включение сигнальной системы ингибирования кроветворения. В системе *in vivo* у мышей, дефицитных по одному из генов рецептора ФНО (p55), увеличивается количество ранних кроветворных предшественников. В системе *in vitro* ФНО- $\alpha$  подавляет пролиферацию кроветворных предшественников [9], т.е. ингибирующий эффект ФНО- $\alpha$  распространяется на кроветворные предшественники разного уровня потентности.

Согласно данным [20, 26, 29], в КМ пациентов с ревматоидным артритом повышен уровень ИЛ-6, ИЛ-8 и ГМ-КСФ. ИЛ-6 является сильным стимулятором дифференцировки полипотентных СКК в направлении коммитированных предшественников с последующим образованием зрелых элементов крови. ИЛ-8 вызывает быструю мобилизацию полипотентных и более дифференцированных кроветворных предшественников из КМ и индуцирует формирование, хемотаксис и активацию нейтрофилов [3], т.е. такого рода преформирование цитокинового профиля вполне может объяснять отмеченные повышение содержания КОЕс-14 и выраженный лейкоцитоз при АА.

unable to maintain a normal hemopoiesis and produce great amount of TNF- $\alpha$ . This cytokine is seemed to induce (directly or indirectly) the signalling system triggering of hemopoiesis inhibition through the own receptor (TNF- $\alpha$ -r). In mice, deficient by one of genes of TNF receptor (p55), an increase in the amount of early hemopoietic progenitors is observed *in vivo*. TNF- $\alpha$  suppresses *in vitro* a hemopoietic progenitor proliferation [9], *i. e.* the TNF- $\alpha$  inhibiting effect is propagated onto hemopoietic progenitors of different potency level.

According to the data [20, 26, 29] in BM of patients with rheumatoid arthritis an increased level of IL-6, IL-8 and GM-CSF is found. IL-6 is a strong stimulator of polypotent HSC differentiation towards to the committed progenitors with following mature blood element formation. IL-8 causes a rapid mobilisation of polypotent and more differentiated hemopoietic progenitors from BM and induces formation, hemotaxis and neutrophil activation [3], *i. e.* this cytokine profile preformation may completely explain the noted CFUs-14 content augmentation and manifested leukocytosis at AA.

Thus, under AA development the cell and tissue substrates of hemopoietic system undergo considerable functional and structural changes [4, 12, 19, 22], *i. e.* conditions for their "specific" perception of physical and chemical cryopreservation factors are formed. This testifies to the fact that the "optimal" conditions for BM cryopreservation of AID patients may differ from those for healthy donor BM.

Under similar conditions of BM cryopreservation of healthy and AA animals there were observed not only different integrity of hemopoietic progenitors, realised functional potential *in vitro* and *in vivo*, but redistribution of progenitors with different commitment extent in these compartments as well. At the same time the various cryopreservation conditions occurred to be "optimal" by providing functional potential of these cells in BM of healthy and AA animals. Moreover, varying the cooling rates and cryoprotectant concentration enabled a targeted better preservation of this or that progenitor subpopulation. Thus, cryopreservation of AA animal BM cells with regimen 1 and 10% DMSO, regimen 2 and 7% DMSO provided the integrity for less differentiated progenitors, but for more differentiated ones it was regimen 3 and 10% DMSO. Firstly, this fact emphasises the competence of previously advanced concept about the fact that cryopreservation is not only the method for bioobject long-term storage, but the capability for a targeted changing its intrinsic state [5, 10]; secondly, namely the possibility to regulate the hemopoietic progenitor state by modifying BM cell cryopreservation conditions opens the perspective for realising in clinical practice, depending on demand, a "controlled" rate of

Таким образом, при развитии АА клеточно-тканевые субстраты кроветворной системы претерпевают существенные функциональные и структурные изменения [4, 12, 19, 22], т.е. создаются условия “специфического” восприятия ими физико-химических факторов криоконсервирования. Это свидетельствует о том, что “оптимальные” условия криоконсервирования КМ больных с АИЗ могут отличаться от таковых для КМ здоровых доноров.

При одних и тех же условиях криоконсервирования клеток КМ здоровых животных и с АА отмечались не только различная сохранность кроветворных предшественников, реализующих функциональный потенциал в системах *in vitro* и *in vivo*, но и перераспределение в этих компартментах предшественников с разной степенью коммитированности. В то же время “оптимальными” по обеспечению функционального потенциала этих клеток в КМ здоровых животных и с АА оказались различные условия криоконсервирования. Более того, варьирование скоростями охлаждения и концентрацией криопротектора позволило целенаправленно сохранить в большей степени ту или иную субпопуляцию предшественников. Так, криоконсервирование клеток КМ животных с АА в режиме 1 и 10%-го ДМСО, в режиме 2 и 7%-го ДМСО обеспечивало сохранность менее дифференцированных предшественников, а в режиме 3 и 10%-го ДМСО – более дифференцированных. Данный факт, во-первых, подчеркивает правомочность ранее выдвинутой концепции о том, что криоконсервирование – это не только метод долгосрочного хранения биообъекта, но и способность целенаправленно изменять его внутреннее состояние (*intrinsic state*) [5, 10]; во-вторых, именно возможность регуляции состояния кроветворных предшественников модификацией условий криоконсервирования клеток КМ открывает перспективу для реализации в клинической практике, в зависимости от запроса ситуации, “управляемого” темпа восстановления в целом лимфогемопозитической системы реципиента. Как показали вышеприведенные данные, такой запрос действительно может быть удовлетворен при реализации использованных условий криоконсервирования.

Существенную роль в оценке результатов выполненных исследований сыграл интегральный критерий в виде ССО показателей. При этом логично задать вопрос, что для обеспечения защитного потенциала КМ является более важным и значимым: сохранность общего содержания кроветворных предшественников вне зависимости от уровня их дифференцировки или их “качественный состав”, а именно гармонизированный профиль предшественников среди формирующих структуры *in*

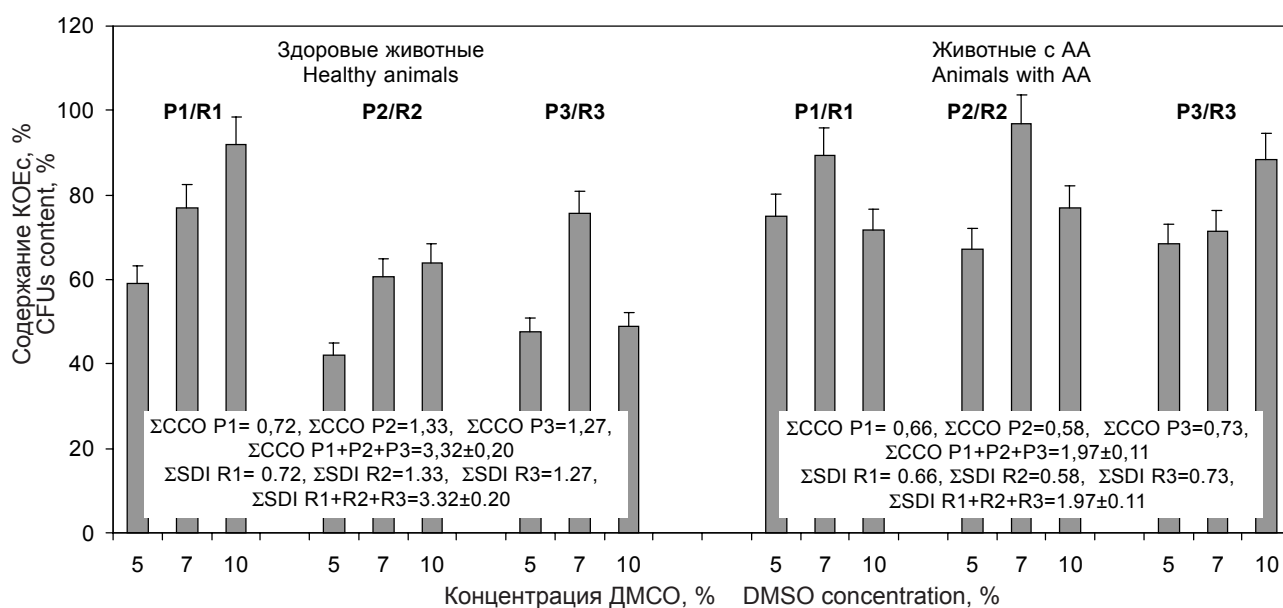
entire recovery of recipient’s lymphohemopoietic system. As the mentioned above data shown, this demand may be really met when realising the used cryopreservation conditions.

An integral criterion in the form of SDE index played a considerable role in estimating results of the research performed. At the same time there is a logic question: whether integrity of general content of hemopoietic progenitors depending on the level of their differentiation or their “qualitative composition”, namely harmonised progenitor profile among the forming structures *in vitro* and *in vivo*, *i.e.* among CFU-GM and CFUs is more important and significant to provide the BM protective potential? By other words, if the role of any (less or more significant) component of SDE, that may distort the general regularities of that or this cryopreservation regimen influence on BM progenitor characterises is not hyperbolised? Due to this of interest are the data on evaluating BM functional characteristics on SDE of all indices, as well as without accounting the progenitor ratio, *i.e.* without IPA CFU-GM and CFUs IPA (Table). Comparing these results testifies to the fact that in both cases the direction of SDE indices change is similar, thereby confirming once again that for healthy animal BM the most acceptable is 1°C/min slow freezing rate with use of 10% DMSO, and 40°C/min with 10% DMSO for AA animal BM. These regimens together with the maximum integrity provide a balanced content of HSC subpopulation, being the closest to the native BM. The decrease extent of CFU-GM content in AA animal BM after cryopreservation in any regimen compared to their amount before freezing was less manifested, than in healthy animal BM (Fig. 3). Indeed, the SDE for healthy animal BM cryopreservation with three regimens, *i.e.* the sum of indices under all the rates and cryoprotectant concentrations made  $3.32 \pm 0.20$  rel. units ( $0.72 + 1.33 + 1.27$ ), meanwhile for AA animal BM it was  $1.97 \pm 0.12$  rel. units ( $0.66 + 0.58 + 0.73$ ) (CFU-GM values of each group before cryopreservation were assumed for 100%). Evidently, “selected” by pathology hemopoietic progenitors in the form of CFU-GM are more resistant to negative effect of cryopreservation factors, that is confirmed by SDE of all indices of BM hemopoietic cell functional potential (Table, Fig. 4). Thus, the area of indices varying under different regimens and cryoprotectant concentrations for AA animal BM are significantly smaller (1.18-1.96) than for healthy animal BM (0.56-2.19). However if under cryopreservation with regimen 1 this “resistance” is much more inherent to more potent progenitors, with regimens 2 and 3 this is for more differentiated ones.

Due to that of special attention are the results of analogous comparison of the response of healthy and

*vitro* и *in vivo*, т.е. среди КОЕ-ГМ и КОЕс? Другими словами, не гиперболизирована ли роль какой-то (менее или более значимой) составляющей ССО, которая может исказить общие закономерности влияния того или иного режима криоконсервирования на характеристики предшественников КМ? В связи с этим интересными являются данные по оценке функциональных характеристик КМ по ССО всех показателей, а также без учета соотношения предшественников, т.е. без ИПА КОЕ-ГМ и ИПА КОЕс (таблица). Сопоставление этих результатов свидетельствует о том, что как в одном, так и другом случае направленность изменения показателей ССО одинакова, подтвердив еще раз, что для КМ здоровых животных наиболее приемлемой является медленная скорость замораживания 1°C/мин с использованием 10%-го ДМСО, а для КМ животных с АА – 40°C/мин с 10%-м ДМСО. Эти режимы, наряду с максимальной сохранностью, обеспечивают и наиболее близкое к нативному КМ сбалансированное содержание субпопуляций СКК. Степень снижения содержания КОЕ-ГМ в КМ животных с АА после криоконсервирования в любом режиме в сравнении с их количеством до замораживания была менее выраженной, чем в КМ здоровых животных (рис.3). Действительно ССО для криоконсервированного КМ здоровых животных в трех режимах, т.е. сумма показателей при всех скоростях и концентрациях криопротектора, составила  $3,32 \pm 0,20$  усл. ед. ( $0,72 + 1,33 + 1,27$ ), тогда как для КМ животных с АА –  $1,97 \pm 0,12$  усл. ед. ( $0,66 + 0,58 +$

АА animal BM CFUs to cryopreservation factors (Fig. 5). According to papers [7, 15] for both subpopulations of healthy animal BM hemopoietic progenitors the cryopreservation, independently on its realisation conditions, acted as the factor suppressing their activity (Fig. 5, a). It is wonder, but for BM CFUs of AA animals the cryopreservation manifested a dualistic activity, which extent and direction were determined by the level of progenitor differentiation (Fig. 5, b). Thus, all three regimens (as for healthy animal BM) inhibited CFUs-14 function, meanwhile a fictional activity of CFUs-8 under all regimens augmented compared to that prior to cryopreservation. At the background of CFUs content, maintained at the level of AA animal native BM, the redistribution of their subpopulation composition (CFUs-14 amount decrease is accompanied with CFUs-8 increase) occurs. However comparing the change extent of one or another progenitors does not enable complete assuming. For example, there are traced the multiplicity irrelevance of decrease in other and increase in another CFUs, mainly with regimen 3. A selective effect of cryopreservation factors on different subpopulations of BM CFUs of healthy and AA donors has remained unclear. This emphasises once again the importance of initial structural and functional state of cells in determining their resistance or sensitivity to cryopreservation factor effect. The expansion of CFUs-8 function in cryopreserved BM of AA animals is a typical example of appearing at that new forms of their interactions with biological object. It is impossible to believe that in this BM after any cryopreservation

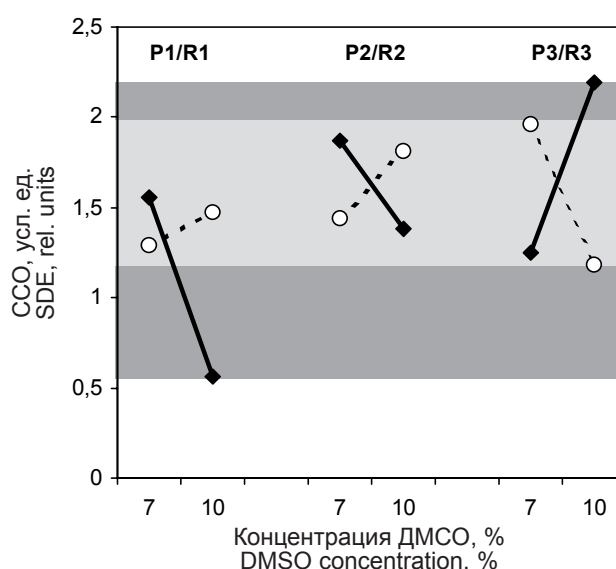


**Рис. 3.** Содержание КОЕ-ГМ в КМ, криоконсервированном при различных режимах. За 100% приняты значения КОЕ-ГМ каждой группы до криоконсервирования.

**Fig. 3.** GM-CFU content in BM, cryopreserved with different regimens. Notes: values for CFU-GM of each group before cryopreservation were assumed as 100%.

0,73) (за 100% приняты значения КОЕ-ГМ каждой группы до криоконсервирования). Очевидно, “избирательно отобранные” патологией кроветворные предшественники в виде КОЕ-ГМ имеют большую устойчивость к отрицательному действию факторов криоконсервирования, что подтверждается ССО всех показателей функционального потенциала кроветворных клеток КМ (таблица, рис. 4). Так, зоны варьирования показателей при разных режимах и концентрациях криопротекторов для КМ животных с АА значительно меньше (1,18-1,96), чем для КМ здоровых животных (0,56-2,19). Однако, если в условиях криоконсервирования в режиме 1 такая “устойчивость” присуща в большей степени более potentным предшественникам, то в режимах 2 и 3 – более дифференцированным.

В связи с этим особого внимания заслуживают результаты аналогичного сравнения ответа на факторы криоконсервирования КОЕс КМ здоровых животных и с АА (рис. 5). В соответствии с данными работ [7, 15], для обеих субпопуляций кроветворных предшественников КМ здоровых животных криоконсервирование, вне зависимости от условий его реализации, выступало в роли фактора, супрессирующего их активность (рис. 5, а). Удивительно, но для КОЕс костного мозга животных с АА криоконсервирование проявляло дуалистическую активность, степень и направленность которой определялась уровнем дифференцировки предшественников (рис. 5, б). Так, все три режима (как и для КМ здоровых животных) ингибировали функцию КОЕс-14, тогда как функциональная активность КОЕс-8 при всех режимах повышалась в сравнении с таковой до криоконсервирования. На фоне сохраняющегося на уровне нативного КМ животных с АА общего содержания КОЕс происходит перераспределение их субпопуляционного состава (уменьшение количества КОЕс-14 сопровождается увеличением КОЕс-8). Однако сопоставление степени изменения тех и других предшественников не позволяет полностью согласиться с этим предположением. Например, прослеживаются явные несоответствия кратности снижения одних и увеличения других КОЕс, особенно при режиме 3. Во многом избирательный эффект факторов криоконсервирования на разные субпопуляции КОЕс костного мозга здоровых доноров и с АА остается неясным. Это еще раз подчеркивает значимость исходного структурно-функционального состояния клеток в определении их устойчивости или чувствительности к действию факторов криоконсервирования. Типичным примером появляющихся при этом новых форм их взаимодействий с биологическим объектом является экспансия функции КОЕс-8 в криоконсерви-



**Рис. 4.** Суммарная степень отклонения всех показателей функционального потенциала кроветворных клеток криоконсервированного КМ в зависимости от режима замораживания: сплошная линия – здоровые животные; пунктирная – животные с АА.

**Fig. 4.** Summary deviation extent of all functional potential indices of cryopreserved BM hemopoietic cells dependent on freezing regimen: solid line – healthy animals; dotted line – animals with AA.

regimen all CFUs-8 are preserved. But even under this conditionality the fact of these cells function “repro-gramming” under cryopreservation effect is evident. Thus cryopreservation may more or less affect the HSC functional status by manifesting in changes of all levels processes of their cell metabolism: perception of regulatory signals of hemopoietic microenvironment by receptor apparatus, its transaction, realisation at transcription and translation levels [15].

## Conclusions

1. There have been established the principle peculiarities of functional status of BM hemopoietic progenitors of various differentiation level of AA animals, manifesting in a change of capability to form hemopoietic structures *in vitro* and *in vivo* compared to healthy animal BM. These peculiarities of HSC functional status are the premise for a change in their resistance to cryopreservation factor effect.

2. Identical conditions for BM cryopreservation of health and AA animals were shown to provide not only different integrity for hemopoietic progenitors, realising functional potential *in vitro* and *in vivo*, but redistribution in these compartments of differently-committed progenitors as well. At the same time the “optimal” cryopreservation conditions on providing functional potential of these cells in both BM occurred to be as follows: for AA animal BM – regimen 3 with

ванном КМ животных с АА. Нельзя считать, что в таком КМ после любого режима криоконсервирования сохраняются все КОЕс-8. Но даже при такой условности очевиден факт “перепрограммирования” функции этих клеток под действием криоконсервирования. Таким образом, процесс криоконсервирования может влиять в той или иной степени на функциональный статус СКК, манифестируясь изменениями процессов всех уровней их клеточного метаболизма: восприятия регуляторных сигналов кроветворного микроокружения рецепторным аппаратом, его трансдукции, реализации на транскрипционном и трансляционном уровнях [15].

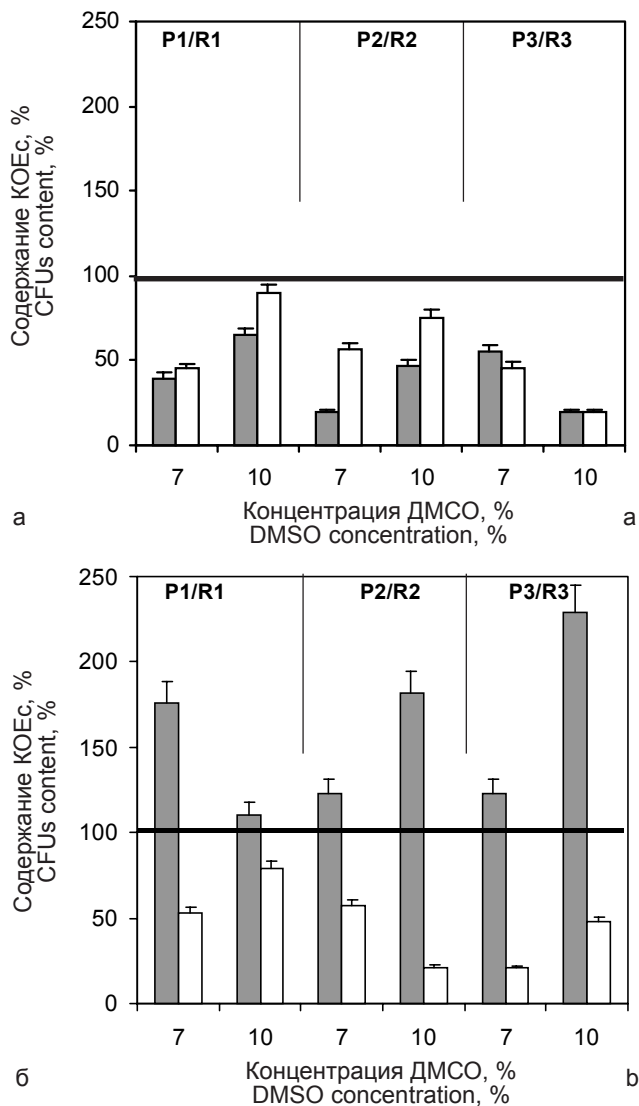
## Выводы

1. Установлены принципиальные особенности функционального статуса кроветворных предшественников КМ разного уровня дифференцировки животных с АА, выражающиеся в изменении их способности формировать гемопоэтические структуры в системах *in vitro* и *in vivo* по сравнению с КМ здоровых животных. Эти особенности функционального статуса СКК являются предпосылкой изменения их устойчивости к действию факторов криоконсервирования.

2. Показано, что идентичные условия криоконсервирования КМ здоровых животных и с АА обеспечивали не только различную сохранность кроветворных предшественников, реализующих функциональный потенциал *in vitro* и *in vivo*, но и перераспределение в этих компартаментах предшественников с разной степенью коммитированности. В то же время “оптимальными” по обеспечению функционального потенциала этих клеток в одном и другом КМ оказались различные условия криоконсервирования: для КМ животных с АА – режим 3 с 10%-м ДМСО, для здоровых – режим 1 с 10%-м ДМСО.

3. Определенные режимы криоконсервирования реализуют в отношении КМ животных с АА эффект “реставрации” искаженной патологией функции кроветворных предшественников разного уровня дифференцировки. Кроме того, для такого КМ при всех режимах криоконсервирования установлен эффект стимуляции функции кроветворных предшественников одного уровня дифференцировки (КОЕс-8) на фоне ингибции другого (КОЕс-14). Данный факт подчеркивает, что криоконсервирование способно выступать в роли регулятора внутреннего состояния (intrinsic state) кроветворных предшественников КМ.

4. Варьирование скоростями охлаждения и концентрацией криопротектора позволяет направленно сохранять в КМ в большей степени ту или иную субпопуляцию предшественников. Так, криокон-



**Рис. 5.** Содержание КОЕс в КМ, криоконсервированном при различных режимах здоровых животных (а) и с АА (б): ■ – КОЕс-8; □ – КОЕс-14. За 100% приняты значения КОЕс каждой группы до криоконсервирования.

**Fig. 5.** CFUs content in healthy (a) and AA animals BM, cryopreserved with different regimens: ■ – CFUs-8; □ – CFUs-14. CFUs values of each group before cryopreservation were assumed as 100%.

10% DMSO, for healthy ones – regimen 1 with 10% DMSO.

3. Certain cryopreservation regimens are realised towards AA animal BM the “restoration” effect of pathology-distorted function of variously differentiated hemopoietic progenitors. In addition, for this BM under the all cryopreservation regimens the effect of function stimulation of hemopoietic progenitors of one differentiation level (CFUs-8) at the background of inhibiting the other one (CFUs-14) has been established. This emphasises the cryopreservation as capable of acting as intrinsic state regulator of BM hemopoietic progenitors.

сервирование КМ животных с АА в режиме 1 и 10%-м ДМСО, а также в режиме 2 и 7%-м ДМСО обеспечивало преимущественно сохранность менее дифференцированных предшественников, в то время как использование режима 3 и 10%-го ДМСО – более дифференцированных. В общем для быстрых скоростей замораживания (с любыми концентрациями криопротектора и для обоих видов КМ) характерно проявление “супрессивного” действия в отношении более потенциальных предшественников как среди КОЕ-ГМ, так и КОЕс.

5. Для обеспечения полноты функционального потенциала кроветворных предшественников КМ здоровых животных переход от медленных скоростей к быстрым требует снижения концентрации криопротектора, а для КМ животных с АА – увеличения.

4. Varying cooling rates and cryoprotectant concentration enables better directed preservation in BM of that or this progenitor subpopulation. Thus, the AA animal BM cryopreservation with regimen 1 and 10% DMSO, as well as regimen 2 and 7% DMSO provided mostly the integrity of less differentiated progenitors, meanwhile for more differentiated ones it was the regimen 3 and 10% DMSO. Generally, for rapid freezing rates (with any cryoprotectant concentration and for both BM) the manifestation of a “suppressive” effect towards more potent progenitors among both GM-CFU and CFUs was typical.

To provide the functional potential entirety for BM hemopoietic progenitors of healthy animals the transition from slow rates to the rapid ones requires a decrease in cryoprotectant concentration but an increase for the AA animal BM.

## Литература

1. *Афанасьев Б.В., Алмазов В.А.* Родоначальные кроветворные клетки человека: физиология и патология.– Л.: Наука, 1985.– 204 с.
2. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 430 с.
3. *Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П.* Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – Киев: Наук. думка, 1998.– 319 с.
4. *Гембицкий Е.В., Мазуров В.И., Лила А.М. и др.* Изменение функциональной активности грануломоноцитопоза у больных ревматоидным артритом // *Клин. мед.*– 1991.– Т. 69, №3.– С.51-54.
5. *Гольцев А.Н.* Влияние факторов криоконсервирования на иммунологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис ... доктора мед. наук.– Харьков, 1988.–35 с.
6. *Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Козлова Ю.А. и др.* Влияние различных режимов криоконсервирования на сохранность стволовых кроветворных клеток костного мозга животных с аутоиммунными заболеваниями. Часть 1. Оценка *in vitro* функционального статуса кроветворных предшественников криоконсервированного костного мозга // *Пробл. кробиологии.*– 2005.– Т.15, №4.– С. 614-621.
7. *Гольцев А. Н., Луценко Е.Д.* Криоконсервирование как возможный метод оценки роли компонентного состава миелотрансплантата в проявлении функциональной активности кроветворных клеток // *Пробл. кробиологии.*– 1994.– №1.– С. 3-13.
8. *Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г., Останков М.В.* Модификация состояния кроветворных клеток костного мозга после криоконсервирования // *Материалы Междунар. конф. “Сохранение генетических ресурсов”.*– СПб, 2004.– С. 783-784.
9. *Дризе Н.И., Друцкая М.С., Герасимова Л.П.* Особенности изменений в кроветворной системе у мышей, дефицитных по ФНО или лимфотоксину- $\alpha$  // *Бюл. эксперим. биол. и мед.*– 2002.– №7.– С. 76-80.
10. *Дубрава Т.Г.* Эффективность криоконсервирования кроветворных клеток в зависимости от их исходных свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1986.– 25 с.
11. *Козлова Ю.А., Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Гурина Т.М.* Предпосылки оптимизации метода криоконсервирования костного мозга животных с аутоиммунной патологией // *Пробл. кробиологии.*– 2004.– №2.– С. 76-83.

## References

1. *Afanasyev B.V., Almazov V.A.* Human germline hemopoietic cells: physiology and pathology.– Leningrad: Nauka, 1985.– 205 p.
2. *Belous A.M., Grischenko V.I.* Cryobiology.– Kiev: Nauk. Dumka, 1994.– 430 p.
3. *Vozianov A.F., Butenko A.K., Zak K.P.* Cytokines. Biological and anti-tumoral properties.– Kiev: Nauk. dumka, 1998.– 319 p.
4. *Gembitsky E.V., Mazurov V.I., Lila A.M. et al.* Change in functional activity of granulomonocytopoiesis in patients with rheumatoid arthritis // *Klin. Med.*– 1991.– Vol. 69, N3.– P. 51-54.
5. *Goltsev A.N.* Effect of cryopreservation factors on immunological properties of bone marrow hemopoietic cells: Author's abstract of thesis of doctor of medical sciences.– Kharkov, 1988.– 35 p.
6. *Goltsev A.N., Dubrava T.G., Kozlova Yu.A. et al.* Effect of different cryopreservation regimens on integrity of bone marrow stem hemopoietic cells in animals with autoimmune diseases. Part 1. In vitro estimation of functional status of cryopreserved bone marrow hemopoietic precursors // *Problems of Cryobiology.*– 2005.– Vol. 15, N4.– P. 614-621.
7. *Goltsev A.N., Lutsenko E.D.* Cryopreservation as a possible method of estimation of the role of myelograft component composition in the functional activity of hemopoietic cells // *Problems of Cryobiology.*– 1994.– N1.– P. 3-13.
8. *Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dubrava T.G., Ostankov M.V.* Modification of state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation // *Materials of International Conference “Genetic resource preservation”.*– Saint-Petersburg, 2004.– P. 783-784.
9. *Drize N.I., Drutskaya M.S., Gerasimova L.P.* Peculiarities of changes in hemopoietic system of TNF or lymphotoxin- $\alpha$  deficient mice // *Bull. Experim. Biol. i Med.*– 2002.– N7.– P. 76-80.
10. *Dubrava T.G.* Efficiency of hemopoieticopietic cells cryopreservation depending on their initial properties: Author's abstract of thesis of candidate of biol. sciences.– Kharkov, 1986.– 25 p.
11. *Kozlova Yu.A., Goltsev A.N., Dubrava T.G., Gurina T.M.* Premises for optimising the method of bone marrow cryopreservation in animals with autoimmune pathologies // *Problems of Cryobiology.*– 2004.– N2.– P. 76-83.
12. *Shmarov D.A.* Estimation of proliferative activity of bone marrow cells using flow cytofluorimetry method // *Klin. lab. diagnostika.*– 1993.– N5.– P.40-43.

12. Шмаров Д.А. Оценка пролиферативной активности клеток костного мозга методом проточной цитофлюориметрии // Клини. лаб. диагностика.– 1993.– №5.– С. 40-43.
13. Burt R.K., Fassas A., Snowden J.A. et al. Collection of hematopoietic cells from patients with autoimmune diseases // Bone Marrow Transplant.– 2001.– Vol. 28, N1.– P. 1-12.
14. Burt R.K., Slavin S., Burns W.H., Marmont A.M. Induction of tolerance in autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation: getting closer to a cure? // Blood.– 2002.– Vol. 99, N3.– P. 768-784.
15. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al. Modification of the state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation // Int. J. Refriger.– 2006.– Vol. 29, N3.– P. 358-367.
16. Harris R.A., Hogarth P.M., Wadeson L.J. et al. An antigenic difference between cells forming early and late hemopoietic spleen colonies // Nature.– 1984.– Vol. 307, N5952.– P. 638-641.
17. Harrison D.E., Jordan C.T., Zhong R.K., Astle C.M. Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations // Exp. Hematol.– 1993.– Vol. 21, N2.– P. 206-219.
18. Joske D.J., Ma D.T., Langlands D.R. Autologous bone marrow transplantation for rheumatoid arthritis // Lancet.– 1997.– Vol. 350, N9074.– P. 337-338.
19. Kawamura M., Hisha H., Li Y. et al. Distinct qualitative differences between normal and abnormal hemopoietic stem cells in vivo and in vitro // Stem Cells.– 1997.– Vol. 15, N1.– P. 56-62.
20. Kuroda T., Tanabe N., Sakatsume M. et al. Interleukin-2 levels are elevated in the bone marrow serum of patients with mutilans-type rheumatoid arthritis // Clin. Rheumatol.– 2002.– Vol. 21, N1.– P. 23-27.
21. Lord B.I., Woolford L.B. Proliferation of spleen colony forming units (CFU-S8, CFU-S13) and cells with marrow repopulating ability // Stem Cells.– 1993.– Vol. 11, N3.– P. 212-217.
22. Papadaki H.A., Kritikos H.D., Gemetzi C. et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis : evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect // Blood.– 2002.– Vol. 99, N5.– P. 1610-1619.
23. Pearson C.M., Wood F.D. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant // Am. J. Pathol.– 1963.– Vol. 42, N2.– P. 73-95.
24. Porta C., Capolari R., Elis O. et al. Impaired bone marrow hematopoietic progenitor cell function in rheumatoid arthritis patients candidate to autologous hematopoietic stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant.– 2004.– Vol. 33, N7.– P. 721-728.
25. Snowden J.A., Passweg J., Moore J.J. et al. Autologous hemopoietic stem cell transplantation in severe rheumatoid arthritis: a report from the EBMT and ABMTR // J. Rheumatol.– 2004.– Vol. 31, N3.– P. 482-488.
26. Tanabe M., Ochi T., Tomita T. et al. Remarkable elevation of interleukin 6 and interleukin 8 levels in the bone marrow serum of patients with rheumatoid arthritis // J. Rheumatol.– 1994.– Vol. 21, N5.– P. 830-835.
27. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Rad. Res.– 1961.– Vol. 14, N12.– P. 213-222.
28. Tyndall A. Haematological stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases: first experiences from an international project // J. Rheumatol.– 1999.– Vol. 38, N4.– P. 482-488.
29. Van Bekkum D.W. BMT in experimental autoimmune diseases // Bone Marrow Transplant.– 1993.– Vol. 11, N3.– P. 183-187.
30. Zipori D. The renewal and differentiation of hematopoietic stem cells // FASEB Journal.– 1992.– Vol. 6, N9.– P. 2691-2697.
13. Burt R.K., Fassas A., Snowden J.A. et al. Collection of hematopoietic cells from patients with autoimmune diseases // Bone Marrow Transplant.– 2001.– Vol. 28, N1.– P. 1-12.
14. Burt R.K., Slavin S., Burns W.H., Marmont A.M. Induction of tolerance in autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation: getting closer to a cure? // Blood.– 2002.– Vol. 99, N3.– P. 768-784.
15. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al. Modification of the state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation // Int. J. Refriger.– 2006.– Vol. 29, N3.– P. 358-367.
16. Harris R.A., Hogarth P.M., Wadeson L.J. et al. An antigenic difference between cells forming early and late hemopoietic spleen colonies // Nature.– 1984.– Vol. 307, N5952.– P. 638-641.
17. Harrison D.E., Jordan C.T., Zhong R.K., Astle C.M. Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations // Exp. Hematol.– 1993.– Vol. 21, N2.– P. 206-219.
18. Joske D.J., Ma D.T., Langlands D.R. Autologous bone marrow transplantation for rheumatoid arthritis // Lancet.– 1997.– Vol. 350, N9074.– P. 337-338.
19. Kawamura M., Hisha H., Li Y. et al. Distinct qualitative differences between normal and abnormal hemopoietic stem cells in vivo and in vitro // Stem cells.– 1997.– Vol. 15, N1.– P. 56-62.
20. Kuroda T., Tanabe N., Sakatsume M. et al. Interleukin-2 levels are elevated in the bone marrow serum of patients with mutilans-type rheumatoid arthritis // Clin. Rheumatol.– 2002.– Vol. 21, N1.– P. 23-27.
21. Lord B.I., Woolford L.B. Proliferation of spleen colony forming units (CFU-S8, CFU-S13) and cells with marrow repopulating ability // Stem Cells.– 1993.– Vol. 11, N3.– P. 212-217.
22. Papadaki H.A., Kritikos H.D., Gemetzi C. et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis : evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect // Blood.– 2002.– Vol. 99, N5.– P. 1610-1619.
23. Pearson C.M., Wood F.D. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant // Am. J. Pathol.– 1963.– Vol. 42, N2.– P. 73-95.
24. Porta C., Capolari R., Elis O. et al. Impaired bone marrow hematopoietic progenitor cell function in rheumatoid arthritis patients candidate to autologous hematopoietic stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant.– 2004.– Vol. 33, N7.– P. 721-728.
25. Snowden J.A., Passweg J., Moore J.J. et al. Autologous hemopoietic stem cell transplantation in severe rheumatoid arthritis: a report from the EBMT and ABMTR // J. Rheumatol.– 2004.– Vol. 31, N3.– P. 482-488.
26. Tanabe M., Ochi T., Tomita T. et al. Remarkable elevation of interleukin 6 and interleukin 8 levels in the bone marrow serum of patients with rheumatoid arthritis // J. Rheumatol.– 1994.– Vol. 21, N5.– P. 830-835.
27. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Rad. Res.– 1961.– Vol. 14, N12.– P. 213-222.
28. Tyndall A. Haematological stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases: first experiences from an international project // J. Rheumatol.– 1999.– Vol. 38, N4.– P. 482-488.
29. Van Bekkum D.W. BMT in experimental autoimmune diseases // Bone Marrow Transplant.– 1993.– Vol. 11, N3.– P. 183-187.
30. Zipori D. The renewal and differentiation of hematopoietic stem cells // FASEB Journal.– 1992.– Vol. 6, N9.– P. 2691-2697.

Accepted in 23.08.2005

Поступила 23.08.2005