

# Влияние разных протоколов замораживания на экспрессию поверхностных маркеров клеток фетальной печени разных сроков гестации

Н.А. Бондарович, А.В. Кузнецов, М.В. Останков, О.В. Челомбитко  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Different Freezing Protocols on Expression of Surface Markers of Fetal Liver Cells of Various Gestation Terms

N.A. Bondarovich, A.V. Kuznyakov, M.V. Ostankov, O.V. Chelombitko  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Клетки фетальной печени (КФП) широко используются в клеточной терапии. Обязательным этапом в их использовании является криоконсервирование. Часто в клинической практике применяют КФП разных сроков гестации, которые *a priori* имеют различную криолабильность в связи со значительной модификацией по мере гестации. Подбор оптимальных условий замораживания КФП разных сроков гестации (скорости охлаждения, концентрации криопротектора) и использование адекватных методов оценки деконсервированного материала остаются актуальными. В связи с этим целью исследования было изучение влияния различных протоколов замораживания на экспрессию фенотипических маркеров КФП разных сроков гестации.

Объектом исследования были КФП мышей C57Bl/14 и 18 суток гестации (КФП-14 и КФП-18). Криоконсервирование КФП проводили под защитой ДМСО в концентрациях 7,5; 10 и 12,5% с использованием двух программ охлаждения: I – со скоростью 1 град/мин до  $-25^{\circ}\text{C}$ ; II – со скоростью 1 град/мин до  $-40^{\circ}\text{C}$ , затем – 10 град/мин до  $-90^{\circ}\text{C}$ ; далее в обоих случаях следовало погружение в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при  $41^{\circ}\text{C}$ . Жизнеспособность клеток определяли по окрашиванию пропидий йодидом. Оценку фенотипии суспензии КФП проводили методом проточной цитометрии на цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США) с использованием моноклональных антител («BD Biosciences», США) к молекулам CD34, CD38, Sca1, CD73 и CD44.

После замораживания-отогрева суспензии КФП-14, независимо от программы охлаждения, отмечено обогащение CD34<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup> клетками. Данный эффект не наблюдался у КФП-18, в которых после замораживания-отогрева наблюдали снижение данного показателя. Использование ДМСО в концентрации 7,5% при обеих программах охлаждения позволило сохранить количество клеток CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> в КФП-14 на уровне первоначальных значений. При этом использование 12,5%-го раствора ДМСО было неоптимальным для сохранения данной популяции клеток, что выражалось в существенном снижении количества CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клеток. С увеличением срока гестации чувствительность CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клеток к концентрации криопротектора существенно изменялась, что было подтверждено данными о наибольшем количестве CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клеток среди КФП-18 при использовании программы II с 12,5% ДМСО. Наиболее высокое содержание CD44<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>-клеток в КФП 14 и 18 суток гестации было получено после их замораживания-отогрева с использованием программы I и 10% ДМСО. Полученные данные подтверждают необходимость тщательного подбора программы криоконсервирования для КФП разных сроков гестации.

Fetal liver cells (FLCs) have been widely used in cell therapy. Mandatory component of technological process of their application is cryopreservation. It is of common occurrence that applied FLCs are of different gestation terms, and *a priori* are of various cryolability due to their significant modification during gestation. Selection of optimal freezing conditions for FLCs of different gestation terms (cooling rate, cryoprotectant concentration) and application of adequate methods of assessing frozen-thawed material has remained an actual task. In this connection the research aim was to study the effect of different freezing protocols on expression of phenotype markers of FLCs of different gestation terms.

The research objects were FLCs derived from C57Bl mice of 14 and 18 gestation day (FLC-14 and FLC-18). FLCs were cryopreserved under protection of DMSO in concentrations of 7.5%; 10% and 12.5% utilizing two programs: I – cooling rate of 1 deg/min down to  $-25^{\circ}\text{C}$ ; II – cooling rate of 1 deg/min down to  $-40^{\circ}\text{C}$  and 10 deg/min down to  $-90^{\circ}\text{C}$ ; in both cases with following plunging into liquid nitrogen. The samples were thawed in water bath at  $41^{\circ}\text{C}$ . Cell viability was examined by staining with propidium iodide. The phenotype of FLCs was assessed by flow cytometry with FACS Calibur (BD, USA) using monoclonal antibodies (BD, USA) against molecules CD34, CD38, Sca1, CD73 and CD44.

After freeze-thawing of FLC-14 suspension independently on cooling program we noted a risen content of CD34<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup> cells. This effect was not found in FLC-18 suspension, where this index reduced after freeze-thawing. Use of DMSO in concentration of 7.5% in all the cryopreservation programs allowed the preservation of the number of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells at the level of the control values in FLC-14. Application of 12.5% DMSO solution was not optimal to preserve this cell population, that was manifested in a significant reduction of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cell number. It is of interest that with a rise in gestation term the sensitivity of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells to cryoprotectant concentration significantly altered, which was confirmed by the data on the highest amount of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells among FLC-18 after application of program II with 12.5% DMSO. The highest number of CD44<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> cells in FLC of 14 and 18 gestation days were obtained after freeze-thawing using program I and 10% DMSO. The findings focus the attention to the need of thorough selection of cryopreservation program for FLCs of different gestation terms.