

УДК 615.014.41:611-013.395:616-092

А.Н. Гольцев, Ю.А. Гаевская*, Т.Г. Дубрава, Л.В. Останкова

Влияние криоконсервирования на функциональный статус стволовых кроветворных и мезенхимальных клеток костного мозга животных с аутоиммунной патологией

UDC 615.014.41:611-013.395:616-092

A.N. Goltsev, Yu.A. Gayevskaya*, T.G. Dubrava, L.V. Ostankova

Effect of Cryopreservation on Functional Status of Bone Marrow Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells in Animals with Autoimmune Pathology

Реферат: Компонентом реконструктивной терапии аутоиммунных заболеваний (АИЗ) является применение криоконсервированного аутологичного костного мозга (КМ). Эффективность использования КМ определяется степенью сохранности его стволовых кроветворных и мезенхимальных клеток (СКК и МСК). Данный факт определяет необходимость разработки оптимальных режимов криоконсервирования КМ доноров с АИЗ. В работе был оценен функциональный статус СКК и МСК костного мозга мышей с адьювантным артритом (АА), инициированным введением полного адьюванта Фрейнда. Костный мозг мышей линии СВА/Н на 14-е сутки АА (хроническая стадия) и КМ здоровых животных криоконсервировали под защитой диметилсульфоксида. Содержание СКК различной степени дифференцировки определяли методом селезеночного колониеобразования *in vivo* на 8-е (КОЕс-8) и 14-е (КОЕс-14) сутки. Функциональную активность МСК в КМ исследовали в условиях *in vitro* по содержанию колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф). Установлен факт изменения функционального потенциала кроветворных предшественников КМ разного уровня дифференцировки (КОЕс-8, КОЕс-14) и их стромального микроокружения (КОЕф) в период клинической манифестации АА. Установлено, что после криоконсервирования клеток КМ животных с АА с 7% ДМСО функциональный потенциал КОЕс и КОЕф был аналогичным показателям КМ здоровых животных, криоконсервированного с 10% ДМСО.

Ключевые слова: костный мозг, стволовые кроветворные клетки, стволовые мезенхимальные клетки, криоконсервирование, аутоиммунная патология.

Реферат: Компонентом реконструктивної терапії аутоімунних захворювань (АІЗ) є застосування криоконсервованого аутологічного кісткового мозку (КМ). Ефективність використання КМ визначається ступенем збереженості його стовбурових кроветвірних і мезенхімальних клітин (СКК і МСК). Даний факт визначає необхідність розробки оптимальних режимів криоконсервування КМ донорів із АІЗ. У роботі оцінено функціональний статус СКК і МСК кісткового мозку мишей із ад'ювантним артритом (АА), ініційованим введенням повного ад'юванта Фрейнда. Кістковий мозок мишей лінії СВА/Н на 14-у добу АА (хронічна стадія) і здорових тварин криоконсервували під захистом диметилсульфоксиду. Вміст СКК різного ступеня диференціювання визначали методом селезінкового колонієутворення *in vivo* на 8-у (КУОс-8) і 14-у (КУОс-14) добу. Функціональну активність МСК у КМ досліджували в умовах *in vitro* за вмістом колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУОф). Встановлено факт зміни функціонального потенціалу кроветвірних попередників КМ різного рівня диференціювання (КУОс-8, КУОс-14) та їх стромального мікрооточення (КУОф) у період клінічної маніфестації АА. Встановлено, що після криоконсервування клітин КМ тварин з АА під захистом 7% ДМСО функціональний потенціал КУОс і КУОф був аналогічним показником КМ здорових тварин, криоконсервованого з 10% ДМСО.

Ключові слова: кістковий мозок, стовбурові кроветвірні клітини, стовбурові мезенхімальні клітини, криоконсервування, аутоімунна патологія.

Abstract: The application of cryopreserved autologous bone marrow (BM) is the reconstructive therapy tool for autoimmune diseases (AIDs). The BM use efficiency is determined by preservation rate of its hematopoietic and mesenchymal stem cells (HSCs and MSCs, respectively). This fact determines the need to design the optimal cryopreservation regimens for the BM of AIDs donors. Here we assessed a functional status of bone marrow HSCs and MSCs of mice with adjuvant arthritis (AA), initiated by Freund's complete adjuvant administration. The bone marrow of CBA/H mice to day 14 of AA (chronic stage) and that of healthy animals were cryopreserved under dimethyl sulfoxide protection. The content of HSCs of various differentiation extent was determined by spleen colony formation *in vivo* to days 8 (CFU-S-8) and 14 (CFU-S-14). Functional activity of MSCs in BM was studied *in vitro* by the content of fibroblast colony forming units (CFU-F). There was established the fact of altering the functional potential of hematopoietic progenitor cells of BM of various differentiation levels (CFU-S-8, CFU-S-14) and their stromal microenvironment (CFU-F) during clinical manifestation of AA. After cryopreservation of AA animals' BM cells with 7% DMSO a functional potential of CFU-S and CFU-F was established to be similar to the healthy animals' BM, cryopreserved with 10% DMSO. The cryopreserved with the proposed regimen autologous BM may be used for a targeted recovery of lymphohemopoietic system in AA animals.

Key words: bone marrow, hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, cryopreservation, autoimmune pathology.

Отдел криопатофизиологии и иммунологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-57-89, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: cryopato@gmail.com

Поступила 29.09.2015
Принята в печать 09.02.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 63–72.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3735789, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: cryopato@gmail.com

Received September, 29, 2015
Accepted February, 09, 2016

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2016. 26(1): 63–72.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Аутоиммунные заболевания (АИЗ) среди патологических состояний организма человека занимают лидирующее место и представляют собой не только серьезную медицинскую, но и социальную проблему. До настоящего времени не отработаны существующие методические подходы лечения АИЗ. В основном для лечения АИЗ применяют препараты, способные подавлять иммуновоспалительный процесс и активность аутореактивных Т-клеток (глюкокортикоиды, цитостатические и иммуномодулирующие препараты, моноклональные антитела и др). Все используемые лекарственные препараты устраняют следствие, а не одну из основных причин возникновения и прогрессирования АИЗ – нарушение механизмов, контролирующих толерантность Т- и В-лимфоцитов к аутоантигенам. Возможным подходом «реставрации» иммунной системы больных с АИЗ, в частности, ревматоидным артритом (РА), является аутологичная трансплантация клеток костного мозга (КМ) на фоне высокодозовой химиотерапии [7, 10]. Обоснованием для разработки такого методического подхода в клинике стали результаты экспериментальных исследований на модели адьювантного артрита (АА). Более 25 лет назад S. Knaan-Shanzer и соавт. [13] показали, что трансплантация как аутологичного КМ животных с АА, так и сингенного КМ здоровых животных имела позитивный лечебный эффект. Более того, была продемонстрирована генетическая стабильность стволовой полипотентной клетки при АИЗ с формированием аутореактивного клона иммунокомпетентных лимфоцитов на более низком уровне ее дифференцировки [13]. Поэтому существует мнение, что при использовании иммуноаблативной терапии с последующей трансплантацией КМ можно «радикально» очистить иммунную систему организма от аутореактивного клона Т-лимфоцитов [7]. Важным аспектом терапевтической состоятельности трансплантируемого КМ является строго сбалансированное соотношение субпопуляций стволовых кроветворных (СКК) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [8, 14, 16]. В работе H.A. Papadaki и соавт. [17] был описан дефект клоногенного потенциала CD34⁺-клеток КМ пациентов с РА. Кроме того, авторы установили снижение содержания этих клеток в коротко и длительно репопулирующих культурах. Отмечено, что одной из причин нарушения функции СКК больных РА является избыточная продукция стромальными клетками КМ цитокина ФНО- α , который через собственный рецептор может ингибировать кроветворение [12, 17]. Кроме того известно, что на разных этапах развития РА значительно изменяется уровень и

Autoimmune diseases (AIDs) are leading human pathologies, being a serious problem both medical and social. To date there is no standard methodological approaches in AIDs therapy so far. Usually the therapy of AIDs involves the preparations, capable of suppressing an immune inflammation and autoreactive T-cells activity (glucocorticoids, cytotoxic and immunomodulatory drugs, monoclonal antibodies, *etc.*). All the used drugs eliminate only the consequences, not the main reasons of AID onset and progress, one of which is a disorder of the mechanisms that trigger T and B cell tolerance to autoantigens. A possible approach of AIDs patient immune system “restoration”, in particular those with rheumatoid arthritis (RA), is an autologous transplantation of bone marrow (BM) cells together with a high-dose chemotherapy [3, 16]. The outcomes of experimental studies conducted in adjuvant arthritis (AA) model allowed to transfer this methodical approach in clinic. More than 25 years ago, S. Knaan-Shanzer *et al.* [10] demonstrated that transplantation of both autologous BM of AA animals and syngeneic BM of healthy animals had a positive therapeutic effect. Moreover, it was shown that stem polypotent cell during AIDs were genetically stable and formed autoreactive clone of immune competent lymphocytes at lower level of its differentiation [10]. Therefore, one believed that using immune ablative therapy followed by BM transplantation could result in a ‘drastic’ clearance of the immune system out of autoreactive T lymphocyte clone [16]. An important aspect of therapeutic consistency of transplanted BM is a strict ratio of subpopulations of hematopoietic and mesenchymal stem cells (HSCs and MSCs, respectively) [11, 14, 20]. Papadaki H.A. *et al.* [15] described the defect of clonogenic potential of CD34⁺ cells of BM in RA patients. In addition, the authors established the reduction of these cells in short- and long-repopulating cultures. It was noted that one of the causes of HSCs dysfunction in RA patients was an excessive production of cytokine TNF- α occurring in BM stromal cells, which might inhibit hemopoiesis through its own receptor [9, 15]. Moreover, it is known that at different stages of RA development the level of other MSCs-produced cytokines, supporting growth of hematopoietic progenitors, significantly changes [14, 17]. As reported by Mohanty S.T. *et al.* [13] a number of fibroblast colony-forming units (CFU-F), including MSCs, in murine BM during AA increased while functional potential was reduced. Our findings testify to a disordered inter-regulatory activity of lymphohemopoietic system substrates in AIDs development.

The BM demand in clinical practice necessitates its cryopreservation for further storage. The efficiency of cryopreservation is known to be determined not only



других, продуцируемых МСК, цитокинов, которые поддерживают рост гемопоэтических предшественников [16, 18]. По данным S. T. Mohanty и соавт. [15] при АА в КМ мышей количество колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф), в состав которых входят МСК, увеличивалось на фоне сниженного функционального потенциала. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении регулирующей активности субстратов лимфогемопоэтической системы в условиях развития АИЗ.

Для применения КМ в клинической практике необходимо его криоконсервирование и хранение. Известно, что эффективность криоконсервирования определяется не только физико-химическими факторами, действующими на клетки в процессе замораживания-отогрева, но и их исходным структурно-функциональным состоянием [16, 18]. Так, криочувствительность клеток КМ может зависеть от уровня дифференцировки, стадии клеточного цикла, степени экспрессии мембранных маркеров, вида предобработки до криоконсервирования (цитостатики, γ -облучение, прекультивирование) и т. д. [4, 11]. Различия структурно-функциональных характеристик клеток КМ здорового организма и с патологией предопределяют разную их криолабильность [8, 17].

Вместе с тем получены убедительные данные о том, что криоконсервирование может быть не только успешным методом для долгосрочного хранения биоматериала, но и фактором управления внутренним состоянием биообъекта [1–3]. Так, имеются свидетельства транзиторного изменения уровня экспрессии генов, связанных с гемопоэтической и иммуномодулирующей активностью, после воздействия определенных режимов криоконсервирования на СКК и МСК фетальной печени поздних сроков гестации, что придало материалу новые функциональные свойства [3]. Очевидна необходимость подбора режима криоконсервирования, способного приблизить функциональный потенциал клеток КМ, измененного патологией, к показателям здоровых животных.

На основании вышесказанного целью работы было экспериментально обосновать выбор режима криоконсервирования КМ животных с АА, способного «реставрировать» функциональный потенциал стволовых кроветворных и мезенхимальных клеток.

Материалы и методы

Все манипуляции выполнены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с

by physical and chemical factors, affecting the cells during freeze-thawing, but also by their initial structural and functional state [14, 17]. For example, a cryosensitivity of BM cells may depend on their differentiation level, stage of cell cycle, expression rate of membrane markers, type of pretreatment before cryopreservation (cytostatics, γ -irradiation, re-culture) *etc.* [2, 5]. Differences in structural and functional characteristics of BM cells of a healthy organism and that with pathology predetermine their various cryolability [15, 20].

Nevertheless, there are the convincing data that the cryopreservation might be not only a successful tool for long-term storage of biological material, but also the factor of controlling an internal state of biological object [6–8]. In particular, there is an evidence of a transient change in the expression level of genes, associated with hematopoietic and immune modulatory activity after the effect of certain cryopreservation regimens on HSCs and MSCs of late gestation fetal liver, providing the material with new functional properties [8]. Thus there is an evident need of selecting the cryopreservation regimen, which would be able to approach the functional potential of pathologically changed BM cells to the indices of healthy animals.

Due to the mentioned above, our research was aimed to experimentally substantiate the selection of cryopreservation regimen for AA animal BM, able to “restore” a functional potential of hematopoietic and mesenchymal stem cells.

Materials and methods

All the manipulations with animals were carried-out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2013) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). The experiments were performed in 4-month-old male CBA/N mice weighing 20–22 g, kept under the standard animal house conditions at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine (Kharkiv). We divided the animals into following groups: group 1 comprised healthy mice ($n = 10$), and group 2 had the animals with AA ($n = 10$). The adjuvant arthritis was induced in mice by subplantar administration of 0.1 ml complete Freund’s adjuvant (Sigma-Aldrich, USA) [12]. The inflammation intensity was assessed to day 14 of AA development by the integral index of clinical manifestation of pathology: arthritis index, which represented a ratio of circumferences of experimental and control ankle joints. In healthy animals the arthritis index was assumed as 1.

положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Эксперименты были проведены на 4-месячных мышах-самцах линии СВА/Н массой 20–22 г, содержащихся в стандартных условиях вивария Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков). Животные были разделены на группы: 1 – здоровые мыши ($n = 10$) и 2 – животные с АА ($n = 10$). Адьювантный артрит индуцировали у мышей субплантарным введением 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда («Sigma-Aldrich», США) [5]. Интенсивность воспалительного процесса оценивали на 14-е сутки развития АА по интегральному показателю клинической манифестации патологии – индексу артрита, который представляет собой отношение окружности опытного голеностопного сустава к контрольному. У здоровых животных индекс артрита был принят за единицу.

Получение суспензии костного мозга. Для получения суспензии КМ животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Клетки КМ вымывали шприцем из бедренных костей средой 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия) и 2% цитрата натрия («Weifang Ensign», Китай) (далее в тексте – рабочая среда). Суспензию клеток получали путем многократного пропускания через иглы уменьшающегося диаметра (0,9–0,4 мм) с дальнейшим очищением через капроновый фильтр. Количество ядросодержащих клеток в суспензии КМ подсчитывали в камере Горяева.

Криоконсервирование клеток костного мозга. Раствор для криоконсервирования КМ готовили на рабочей среде с добавлением 14 или 20% диметилсульфоксида (ДМСО) («Arterium», Украина). К полученным на рабочей среде суспензиям клеток КМ по каплям добавляли раствор для криоконсервирования в соотношении 1:1 при 4°C (конечная концентрация криопротектора составляла 7 и 10%). Экспозицию клеток в криоконсервирующем растворе проводили в течение 10 мин при той же температуре.

Клетки КМ с концентрацией $6,0 \times 10^6$ кл/мл криоконсервировали на программном замораживателе («Cryoson», Германия) в полиэтиленовых ампулах объемом 1,8 мл («Nunc», Германия): охлаждали со скоростью 1 град/мин до -40°C с последующим погружением ампул в жидкий азот [1]. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 38...40°C в течение 40–50 с до исчезновения твердой фазы. Клетки отмывали от ДМСО

Derivation of bone marrow suspension. To derive BM suspension the animals were decapitated under light ether anesthesia. The BM cells were washed out with syringe from femurs using medium 199 (Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russia) supplemented with 10% embryonic calf serum (BioloT, Russia) and 2% sodium citrate (Weifang Ensign, China) (hereinafter the handling medium). The cell suspension was derived by repeated passage through the needles of decreasing diameter (0.9–0.4 mm) with the following passing through a nylon filter. The number of nucleated cells in BM suspension were counted in Goryaev's chamber.

Cryopreservation of bone marrow cells. A solution for BM cryopreservation was prepared with the handling medium supplemented with 14 or 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Arterium, Ukraine). Solution for cryopreservation was dropwise added in 1:1 ratio at 4°C (final cryoprotectant concentration was 7 and 10%) to the obtained with handling medium BM cell suspensions. The cells were exposed in cryopreserved solution for 10 min at the same temperature.

BM cells of 6.0×10^6 cells/ml concentration were cryopreserved using the programmed freezer (Cryoson, Germany) in 1.8 ml plastic vials (Nunc, Germany): cooled with the rate of 1 deg/min down to -40°C and then immersed into liquid nitrogen [6]. The samples were thawed in 38...40°C water bath for 40–50 seconds until disappearance of a solid phase. The cells were washed of DMSO by slow addition of double volume of handling medium with the following centrifugation (200g, 10 min).

Assessment of the functional capacity of BM hematopoietic stem cells in vivo. The BM content of hematopoietic progenitor cells, producing colony-forming units in the spleen of lethally irradiated mice (CFU-S) was determined by the method of J.E. Till and E.A. McCulloch [19]. Fresh or cryopreserved BM cell suspensions in dose of 1×10^5 cells/mouse in 0.2 ml handling medium were injected into the tail vein of mice recipients irradiated using RUM-17 device (Mosrentgen, Russia) in 8 Gy dose. The irradiation conditions were as follows: dose rate of 38.6 R/min, 220 kV tube voltage; 10 mA current intensity, 1 mm Cu + 1 mm Al filters; 50 cm focus-dorsal distance. The animals were irradiated in a plexiglass box with individual cells. After irradiation, the experimental animals were treated with Enroksil antibiotic (KRKA, Slovenia) and had whey as food additive for two weeks. The contents of CFU-S was determined by the number of colonies formed in the spleen of lethally irradiated recipients to the 8th (CFU-S-8) and 14th (CFU-S-14) days after administration of BM suspensions. To assess the distribution in BM of CFU-S of various differentiation level



медленным добавлением двукратного объема рабочей среды с последующим центрифугированием (200g, 10 мин).

Оценка функционального потенциала стволовых кроветворных клеток КМ in vivo. Содержание в КМ кроветворных предшественников, формирующих колониобразующие единицы в селезенке летально облученных мышей (КОЕс), определяли по методу J.E. Till и E.A. McCulloch [20]. Нативные и криоконсервированные клеточные суспензии КМ в дозе 1×10^5 кл/мышь в 0,2 мл рабочей среды вводили в хвостовую вену облученным на установке «РУМ-17» («Мосрентген», Россия) в дозе 8 Гр мышам-реципиентам. Условия облучения: мощность дозы – 38,6 Р/мин, напряжение на трубке – 220 кВ; сила тока – 10 мА, фильтры – 1 мм Cu + 1 мм Al; фокусно-дorzальное расстояние – 50 см. Животных облучали в коробке из оргстекла с индивидуальными ячейками. После облучения экспериментальные животные в течение двух недель получали антибиотик «Энроксил» («KRKA», Словения) и молочную сыворотку. Содержание КОЕс определяли по количеству колоний, образованных в селезенках летально облученных реципиентов на 8-е (КОЕс-8) и 14-е (КОЕс-14) сутки после введения суспензий КМ. Для оценки распределения в КМ КОЕс разной степени дифференцировки (более дифференцированными являются КОЕс-8, менее – КОЕс-14 [14]) использовали индекс дифференцировки (ИД), представляющий собой отношение количества КОЕс-14 к КОЕс-8.

Оценка функционального потенциала мезенхимальных стволовых клеток КМ. Содержание в КМ колониобразующих единиц фибробластов (КОЕф), которое по данным S. Hirohata [12] коррелирует с содержанием МСК, определяли при культивировании КМ *in vitro* с плотностью эксплантации 1×10^4 кл/см² в присутствии облученных (5 Гр) фидерных клеток КМ (2×10^5 кл/см²) морской свинки [6]. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C в стеклянных чашках Петри ($d = 3$ см, «Anumbra», Чехия) в течение 14 суток в среде «Iscov's» («Sigma», США) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки. На 14-е сутки определяли количество колоний, содержащих не менее 50 клеток, с помощью светового микроскопа «МИКМЕД-2» («ЛОМО», Россия) и инвертированного микроскопа «Axiovert 40C» («Zeiss», Германия).

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы «Excel» («Microsoft», США). Данные приводили в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

(CFU-S-8 were more differentiated, and CFU-S-14 were less differentiated [11]) an index of differentiation (ID) was used, which was the ratio of CFU-S-14 and CFU-S-8 concentrations.

Assessment of the functional capacity of BM mesenchymal stem cells. The BM content of colony forming units of fibroblasts (CFU-F) which according to S. Hirohata [9] correlated with the content of MSCs was determined by BM culturing *in vitro* with explantation density of 1×10^4 cells/cm² with irradiated (5 Gy) BM feeder cells (2×10^5 cells/cm²) of guinea pig [4]. The culturing was performed in CO₂ incubator at 37°C on a glass Petri dish ($d = 3$ cm, Anumbra, Czech Republic) for 14 days in Iscov's medium (Sigma, USA) supplemented with 10% embryonic calf serum. To the 14th day, the number of colonies of at least 50 cells was determined with light microscope MIKMED-2 (LOMO, Russia) and inverted microscope Axiovert 40C (Carl Zeiss, Germany).

The obtained data were statistically processed with Student's method using Excel software (Microsoft, USA). The data were presented as the mean \pm standard deviation. Differences were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Swelling of joints is one of the clinical signs of AA development, the severity of which was evaluated by arthritis index [20]. To the 14th day after administration of Freund's adjuvant, this index was 1.6 times higher than the control (1.0), that indicated development of AA.

Assessment of the functional state of BM stem cells in animals with AA showed the significant differences in colony-forming activity of CFU-S-8 and CFU-S-14 if compared with those in healthy animals (Fig. 1A). A significant decrease (2.5 times, $p < 0.05$) in the number of CFU-S-8 formed colonies was accompanied by 1.3 times increase in the content of CFU-S-14 formed colonies, which caused the rise of ID if compared with the control (3.65 ± 0.19) and (1.0 ± 0.05), respectively, $p < 0.05$). Established in our research redistribution in subpopulations of CFU-S with various differentiation level which accompanied AA development could be the evidence of changes in structural and functional characteristics. For example, in our previous studies we have shown that AA resulted in a lack of the most differentiated hematopoietic progenitor cells (colony-forming units of granulomonocytopenesis in BM) that could be a possible reason for increased content of more potent CFU-S-14 [6, 20]. Such redistribution of hematopoietic progenitor cells in BM might arise from developing inflammation in an organism. Indeed, AA development is accompanied with a significant change in cytokine



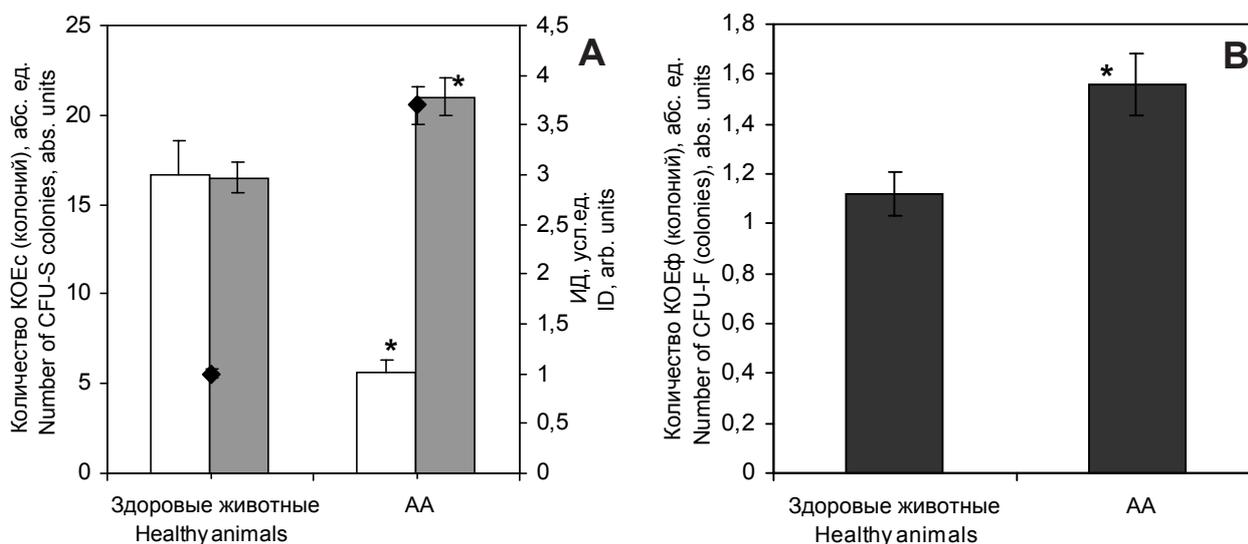


Рис. 1. Количество колоний, формируемых КОЕс (А) и КОЕф (В), КМ здоровых животных и с АА: □ – КОЕс-8; ■ – КОЕс-14; ◆ – индекс дифференцировки (ИД) КОЕс (КОЕс-14/КОЕс-8); * – различия статистически значимы по сравнению с показателями здоровых животных ($p < 0,05$).

Fig. 1. The number of colonies formed by CFU-S (A) and CFU-F (B), BM of healthy animals and those with AA: □ – CFU-S-8; ■ – CFU-S-14; ◆ – index of differentiation (ID) of CFU-S (CFU-S-14/CFU-S-8); * – differences are statistically significant if compared with indices of healthy animals ($p < 0.05$).

Результаты и обсуждение

Одним из клинических признаков развития АА является отек суставов, тяжесть которого оценивали по индексу артрита [8]. На 14-е сутки после введения адьюванта Фрейнда этот показатель в 1,6 раза превышал контрольный (1,0), что свидетельствовало о развитии АА.

Результаты оценки функционального состояния стволовых элементов КМ животных с АА показали существенные отличия колониеобразующей активности КОЕс-8 и КОЕс-14 по сравнению с таковыми у здоровых животных (рис.1, А). Значительное уменьшение (в 2,5 раза, $p < 0,05$) количества колоний, формируемых КОЕс-8, сопровождалось увеличением в 1,3 раза содержания колоний, формируемых КОЕс-14, что вызывало увеличение ИД по сравнению с контролем ($3,65 \pm 0,19$ и $1,0 \pm 0,05$ соответственно, $p < 0,05$). Установленное в нашей работе перераспределение субпопуляционного состава КОЕс разной степени дифференцировки при развитии АА может быть только свидетельством изменения структурно-функциональных характеристик. Например, в наших предыдущих исследованиях было показано, что при АА недостаток наиболее дифференцированных кроветворных предшественников – колониеобразующих единиц грануломоноцитопоза в КМ является возможной причиной увеличения содержания более потенциальных КОЕс-14 [1, 8]. Такое перераспределение кроветворных предшествен-

profile in an organism [15, 17, 18], and haematopoietic system quickly responds to that. According to S.P. Sivalingam *et al.* [17] the patients with AA have increased levels of IL-6, IL-8 interleukins and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. It is known that IL-6 stimulates differentiation of pluripotent HSCs, including high-proliferating CFU-S-14, and IL-8 controls the formation, chemotaxis and activation of neutrophils, being the main cell substrate of leukocytosis at AA. Moreover, HSCs interact closely with MSCs [1, 14]. It is important that the increasing in content of more potent CFU-S (CFU-S-14) in BM of mice with AA correlated with the rise (in 1.4 times) of CFU-F content in BM of healthy animals (1.56 ± 0.13 and 1.12 ± 0.10 , respectively, $p < 0.05$) (Fig. 1, B). It is possible that regulatory mediators produced by MSCs are more capable of stimulating the growth of more potent HSCs and/or inhibit the function of CFU-S-8.

It is known that a change in the structural and functional characteristics of BM cells affects their resistance to cryopreservation factors [2, 6, 8]. Our assessment showed that cryoresistance of bone marrow HSCs and MSCs in healthy animals and animals with AA was different.

As shown in Fig. 2, A, a freezing regimen with 10% DMSO provided the highest preservation of functional potential of CFU-S-8 and CFU-S-14 of healthy animals' BM (67.50 ± 0.84 and 88.00 ± 6.16 , respectively) with some increase of ID (1.30 ± 0.08). Response to cryopreservation of CFU-S from animals



ников в КМ может быть следствием развивающегося в организме воспалительного процесса. Действительно, при развитии АА существенно изменяется цитокиновый профиль организма [17–19], на что быстро реагирует гемопоэтическая система. Согласно данным S.P. Sivalingam и соавт. [18] у пациентов с РА повышен уровень интерлейкинов ИЛ-6, ИЛ-8 и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Известно, что ИЛ-6 является стимулятором дифференцировки полипотентных СКК, к которым можно отнести высокопролиферирующие КОЕс-14, а ИЛ-8 контролирует формирование, хемотаксис и активацию нейтрофилов основного клеточного субстрата лейкоцитоза при АА. Кроме того, СКК находятся в тесном взаимодействии с МСК [9, 16]. Важен тот факт, что повышение содержания более potentных КОЕс (КОЕс-14) в КМ мышей с АА коррелировало с увеличением (в 1,4 раза) содержания КОЕф в КМ здоровых животных ($1,56 \pm 0,13$ и $1,12 \pm 0,10$ соответственно, $p < 0,05$) (рис. 1, В). Возможно, что продуцируемые МСК регуляторные медиаторы в большей степени способны стимулировать рост более potentных СКК и/или ингибировать функцию КОЕс-8.

Известно, что изменение структурных и функциональных характеристик клеток КМ влияет на их устойчивость к воздействию факторов криоконсервирования [1, 3, 4]. Результаты проведенной нами оценки криоустойчивости СКК и МСК костного мозга здоровых животных и животных с АА различны.

Как видно из рис. 2, А, режим замораживания с 10% ДМСО обеспечивал наибольшую сохранность функционального потенциала КОЕс-8 и КОЕс-14 КМ здоровых животных ($67,50 \pm 0,84$ и $88,00 \pm 6,16$ соответственно) с некоторым повышением ИД ($1,30 \pm 0,08$). Ответ на криоконсервирование КОЕс животных с АА зависел от используемой концентрации криопротектора. При замораживании с 10%-м раствором ДМСО показатели сохранности обоих видов КОЕс и ИД были наиболее близки к нативному КМ животных с АА, т. е. с существенным повышением ИД. Уменьшение концентрации ДМСО до 7% обеспечивало максимально сбалансированное соотношение обеих субпопуляций КОЕс костного мозга животных с АА и сохранение высокой их колониобразующей функции (около 60% КОЕс-8 и 70% КОЕс-14) по сравнению с нативным КМ здоровых животных.

Очевидно, что после криоконсервирования даже КМ здоровых животных показатели колониобразующей активности обоих типов КОЕс изменялись, что соответствует полученным ранее результатам [4, 11]. При этом минимальные отклонения иссле-

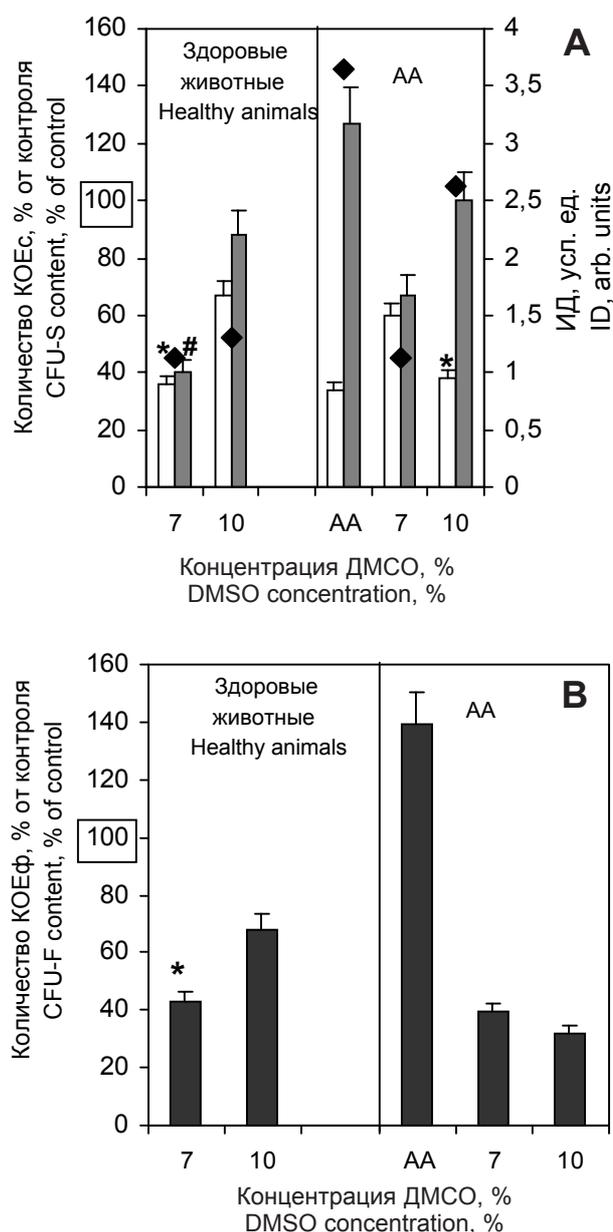


Рис. 2. Количество колоний, формируемых КОЕс (А) и КОЕф (В) криоконсервированного КМ здоровых животных и с АА: □ – КОЕс-8; ■ – КОЕс-14; ◆ – ИД. За 100% принято количество колоний, формируемых нативным КМ здоровых животных; ИД нативного КМ здоровых животных принят за единицу. Различия статистически значимы ($p < 0,05$) по сравнению с: * – КОЕс-8 КМ здоровых животных, криоконсервированного с 10% ДМСО; # – КОЕс-14 КМ здоровых животных, криоконсервированного с 10% ДМСО.

Fig. 2. The number of colonies formed by CFU-S (A) and CFU-F (B) of cryopreserved BM of healthy animals and those with AA: □ – CFU-S-8; ■ – CFU-S-14; ◆ – ID. The number of colonies formed by native BM of healthy animals was assumed as 100%; ID of native BM of healthy animals was assumed as 1. Differences are statistically significant ($p < 0.05$) if compared with: * – BM CFU-S-8 of healthy animals cryopreserved with 10% DMSO; # – BM CFU-S-14 of healthy animals cryopreserved with 10% DMSO.

двух показателей от контроля были получены при использовании 10%-го раствора ДМСО. Результаты криоконсервирования для КОЕс КМ животных с АА были неодинаковыми и зависели от уровня их дифференцировки. Так, все применяемые концентрации криопротектора в разной степени ингибировали колониеобразующий потенциал КОЕс-14 по сравнению с нативным КМ животных с АА. В то же время активность КОЕс-8 при использовании 7%-го раствора ДМСО даже повышалась. Важно, что при использовании такой концентрации криопротектора реализовывался эффект «реставрации» колониеобразующего потенциала КМ, модифицированного патологией, т. е. «гармонизировались» показатели СКК.

Что касается пула МСК, а именно КОЕф (рис. 2, В), то максимальная их сохранность в КМ здоровых мышей была получена после использования 10%-го ДМСО. В КМ животных с АА криоконсервирование обеспечивало сохранность КОЕф от 30 до 40% независимо от концентрации криопротектора.

Установлено, что «оптимальными» для сохранения функционального потенциала КОЕс и КОЕф КМ здоровых животных и с АА оказались различные условия криоконсервирования. Так, для криоконсервирования КМ здоровых животных использовали 10% ДМСО, а животных с АА – 7% ДМСО. Для КМ животных с АА выбранный режим позволяет приблизить к физиологическому соотношению клеток стволового компартмента разной степени дифференцировки. Во многом избирательный эффект факторов криоконсервирования на разные субпопуляции КОЕс костного мозга здоровых доноров и с АА окончательно не изучен. За последнее время накоплены экспериментальные данные, свидетельствующие об изменении уровня экспрессии некоторых генов в СКК и МСК после криоконсервирования [2, 3], что может влиять на восприятие регуляторных сигналов клеточного микроокружения рецепторным аппаратом СКК [11] и искажать их колониеобразующий потенциал. К тому же клетки самого микроокружения (как показано на примере КОЕф) претерпевают не менее выраженные изменения как при развитии АА, так и после криоконсервирования.

Таким образом, полученные результаты подтверждают факт зависимости сохранности функциональной активности СКК и МСК от их исходного состояния и условий криоконсервирования.

Выводы

1. Установлен факт изменения функционального потенциала клеточных предшественников

with АА depended on the concentration of used cryoprotectant. Following freeze-thawing with 10% DMSO the integrity indices of both types of CFU-S and ID were closest to the fresh BM of animals with АА, *i. e.* with a significant increase of ID. Reduction of DMSO concentration down to 7% provided the maximum balanced ratio of both CFU-S subpopulations of animal bone marrow with АА and preservation of their high colony-forming function (about 60% of CFU-S-8 and 70% of CFU-S-14) if compared with native BM of healthy animals.

It was obvious that even after cryopreservation of BM from healthy animals the indices of colony-forming activity of both CFU-S types were changed, that corresponded to the previous results [2, 5]. Herewith, minimum deviations of the studied indices from the control were obtained when using 10% DMSO. The outcomes of cryopreservation for CFU-S of the animals BM with АА were unequal and depended on their differentiation level. In particular, all the used cryoprotectant concentrations variously inhibited colony-forming potential of CFU-S-14 if compared with non-frozen-thawed BM of animals with АА. At the same time, CFU-S-8 activity even increased in case of using 7% DMSO. It is important that using of 7% DMSO caused the effect of “restoration” of colony-forming potential of pathologically modified BM, *i. e.* HSCs indices were “harmonized”.

In regard to MSCs pool, especially CFU-F (Fig. 2B), their maximum preservation in BM of healthy mice was obtained after using 10% DMSO. In BM of animals with АА cryopreservation provided the preservation of 30 to 40% CFU-F, irrespective of cryoprotectant concentration.

It was found that preservation of the functional capacity of CFU-S and CFU-F of healthy animal BM and those with АА required different “optimal” conditions of cryopreservation. For example, 10% DMSO was the best for BM cryopreservation of healthy animals, while 7% DMSO for animals with АА. For BM of animals with АА a selected regimen allowed the ratio of stem cells of various differentiation level to approach the physiological value. Generally speaking, selective effect of cryopreservation factors on different subpopulations of CFU-S of healthy donors’ bone marrow and those with АА is not completely studied. There are recent experimental data testifying to the change in expression level of some genes in HSCs and MSCs after cryopreservation [7, 8], which can affect the perception of regulatory signals of hematopoietic microenvironment with receptor apparatus of HSCs [5] and result to a distortion of their colony-forming potential. Moreover, microenvironment cells (as shown in CFU-F) undergo the



КМ разного уровня дифференцировки (КОЕс-8, КОЕс-14) и их стромального микроокружения (КОЕф) в период клинической манифестации АА.

2. Экспериментально обоснован выбор режима криоконсервирования КМ животных с АА, способного «реставрировать» функциональный потенциал клеток стволового компартмента. Установлено, что после криоконсервирования клеток КМ животных с АА с 7% ДМСО функциональный потенциал КОЕс и КОЕф был аналогичным показателям КМ здоровых животных, криоконсервированного с 10% ДМСО.

Коллектив авторов выражает благодарность за выполнение работ по криоконсервированию клеток костного мозга ст. н. с. отдела долгосрочного хранения биологических объектов при низких температурах и криомикробиологии д. б. н. Т. М. Гуриной.

Литература

1. 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. Ч. 1. Оценка *in vitro* функционального статуса кроветворных предшественников криоконсервированного костного мозга // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №4. – С. 614–621.
2. Гольцев А.М., Луценко О.Д., Ямпольська Е.Е. та ін. Початковий стан – фактор, який визначає кріолабільність стовбурових клітин: Зб. тез III з'їзду Укр. товариства клітинної біології з міжнарод. участю. – Ялта, 2012. – С. 114.
3. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г. и др. Криоконсервирование как фактор модификации структурно-функционального состояния и механизма реализации лечебного эффекта клеток стволового компартмента в условиях развития патологий аутоиммунного генеза // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под. ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – 767 с.
4. Дубрава Т.Г. Эффективность криоконсервирования кроветворных клеток в зависимости от их исходных свойств: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Харьков, 1986. – 25 с.
5. Міщенко О.Я., Котвіцька А.А. Фармакологічна ефективність емульсії анальбену на моделі ад'ювантного артриту у щурів // Вісник фармації. – 2001. – №3. – С.124–125.
6. Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. – М.: Медицина, 1973. – 223 с.
7. Шевченко Ю.Л., Новик А.А., Кузнецов А.Н. и др. Высокодозная иммуносупрессивная терапия с аутологичной трансплантацией кроветворных стволовых клеток при рассеянном склерозе: международный и отечественный опыт // Международный неврологический журнал. – 2012. – Т. 47, №1. – С. 145–150.
8. Ямпольська Е.Е., Гаєвська Ю.А., Дубрава Т.Г., Гольцев А.Н. Оценка гемопоэтического статуса животных с адьювантным артритом до и после введения криоконсервированных клеток фетальной печени // Криотерапия как инновационный метод в клинической практике: Сб. научных работ / Под ред. О.А. Панченко. – К.: Изд-во КБИЦ, 2013. – С. 80–87.

changes of the same range both at AA development and after cryopreservation.

Thus, the obtained results confirm the preservation of functional activity of HSCs and MSCs to be depending on their initial state and cryopreservation conditions.

Conclusions

1. There was established the fact of changed functional capacity in BM hematopoietic progenitor cells of various differentiation level (CFU-S-8, CFU-S-14) and their stromal microenvironment (CFU-F) during the AA clinical manifestation.

2. There was experimentally proven the selection of regimen for cryopreservation of BM from animals with AA, which was capable to “restore” functional potential of stem cells. It was found that cryopreservation of BM cells from animals with AA using 7% DMSO resulted in the approaching of functional potential of CFU-S and CFU-F to the indices of healthy animals' BM cells, cryopreserved with 10% DMSO.

The authors acknowledge Dr. T.M. Gurina, Senior Research Fellow of the Department of Long-Term Storage of Biological Objects Under Low Temperatures and Cryomicrobiology for the assistance in cryopreservation of bone marrow cells.

References

1. Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28(8): 875–884.
2. Dubrava T.G. Efficiency of hematopoietic cell cryopreservation depending on their initial properties [Authors abstract of doctoral thesis]. Kharkov; 1986.
3. Farge D., Labopin M., Tyndall A. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European group for blood and marrow transplantation working party on autoimmune diseases. *Haematologica* 2010; 95(2): 284–292.
4. Friedenstein A.Y., Lalykina K.S. Induction of bone tissue and osteogenic progenitors. Moscow: Meditsina; 1973: 223 p.
5. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al. Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation. *Int J Refrigeration* 2006; 29(3): 358–367.
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. *Problems of Cryobiology* 2005; 15(4): 614–621.
7. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Yampolska K.Ye. et al. Initial state – factor determining cryolability of stem cells. *Proceeding of the 3rd Meeting of Ukrainian Society for Cell Biology*; Yalta, 2012: p. 114.
8. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Dubrava T.G. et al. Cryopreservation as a factor modifying the structural and functional state and mechanism of implementation of the therapeutic effect of stem cell compartment in conditions of development of autoimmune pathologies genesis. In: Goltsev A.N., editor.



9. Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses // *Exp. Hematol.* – 2000. – Vol. 28, №8. – P. 875–884.
10. Farge D., Labopin M., Tyndall A. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European group for blood and marrow transplantation working party on autoimmune diseases // *Haematologica.* – 2010. – Vol. 95, №2. – P. 284–292.
11. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al. Modification of the state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation // *Int J Refreg.* – 2006. – Vol. 29, №3. – P. 358–367.
12. Hirohata S. Role of bone marrow in the pathogenesis of rheumatoid arthritis // *Challenges in Rheumatology* / Ed. by M. Harjacek. – Rijeka, Croatia, 2011. – P. 27–36.
13. Knaan-Shanzer S., Houben P., Kinwel-Bohre E.P. et al. Remission induction of adjuvant arthritis in rats by total body irradiation and autologous bone marrow transplantation // *Bone Marrow Transplant.* – 1991. – Vol. 8, №5. – P. 333–338.
14. 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, №3. – P. 212–217.
15. Mohanty S.T., Kottam L., Gambardella A. et al. Alterations in the self-renewal and differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells in a mouse model of rheumatoid arthritis // *Arthritis Res. Ther.* – 2010. – Vol. 12, №4. – P. R149.
16. Morrison S.J., Scadden D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells // *Nature.* – 2014. – Vol. 505, №7483. – P. 327–334.
17. 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, №5. – P. 1610–1619.
18. Sivalingam S.P., Thumboo J., Vasoo S. et al. In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis // *Ann. Acad. Med. Singapore.* – 2007. – Vol. 36, №2. – P. 96–99.
19. 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, №5. – P. 830–835.
20. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // *Rad. Res.* – 1961. – Vol. 14, №12. – P. 213–222.
- Current problems of cryobiology and cryomedicine; Kharkov, 2012: 551–563.
9. Hirohata S. Role of bone marrow in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Harjacek M., editor. *Challenges in Rheumatology.* Rijeka, Croatia, 2011: p. 27–36.
10. Knaan-Shanzer S., Houben P., Kinwel-Bohre E.P. et al. Remission induction of adjuvant arthritis in rats by total body irradiation and autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8(5): 333–338.
11. 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; 11(3): 212–217.
12. Mishchenko O.Ya., Kotvits'ka A.A. Farmakologichna effectiveness emulsion analbenu adyuvantnoho on the model of arthritis in rats. *Visnyk Farmatsii* 2001; (3): 124–125.
13. Mohanty S.T., Kottam L., Gambardella A. et al. Alterations in the self-renewal and differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(4): R149.
14. Morrison S.J., Scadden D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; 505(7483): 327–334.
15. 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; 99(5): 1610–1619.
16. Shevchenko Y.L., Novik A.A., Kuznetsov A.N. et al. High-dose immunosuppressive therapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis: international and domestic experience. *International Neurological Journal* 2012; 47(1): 145–150.
17. Sivalingam S.P., Thumboo J., Vasoo S. et al. In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36(2): 96–99.
18. 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; 21(5): 830–835.
19. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213–222.
20. Yampolskaya K.Ye., Gayevskaya Yu.A., Dubrava T.G., Goltsev A.N. Assessment of hematopoietic status of animals with adjuvant arthritis before and after the introduction of cryopreserved fetal liver cells. In: Panchenko O.A., editor. *Cryotherapy as an innovative method in clinical.* Kiev: KBITS, 2013: 80–87.

