

Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации

UDC 615.014.41:611.36.013.018.1

A.N. GOLTSEV*, T.G. DUBRAVA, L.V. OSTANKOVA, V.I. GRISCHENKO,
E.YE. YAMPOLSKAYA, M.V. OSTANKOV, N.A. BONDAROVICH, M.A. SIROUS

Peculiarities of Cryopreservation Effect on Functional Potential of Fetal Liver Hemopoietic Stem Cells of Various Gestation Terms

Способность криоконсервирования модифицировать структурно-функциональный статус биообъекта, в том числе клеток фетальной печени (КФП), может использоваться для оптимизации клеточной и тканевой терапии. Эффективность применения КФП определяется присутствием в них широкого спектра клеточных популяций, в которых ключевую роль играют стволовые кроветворные клетки. Установлено изменение фенотипических и функциональных характеристик КФП с пролонгацией срока гестации, что выражалось в снижении их колониеобразующего потенциала, количества CD34⁺- и одновременном увеличении Mac-1⁺- и LFA-1⁺-клеток. Показано, что криоконсервирование селективно обогащает КФП 18 суток гестации кроветворными предшественниками с большим пролиферативным потенциалом. Данный факт может быть определяющим в проявлении их терапевтического эффекта.

Ключевые слова: клетки фетальной печени, криоконсервирование, кроветворные предшественники.

Здатність криоконсервування модифікувати структурно-функціональний статус біооб'єкта, у тому числі клітин фетальної печінки (КФП), може використовуватися для оптимізації клітинної і тканинної терапії. Ефективність застосування КФП визначається присутністю в них широкого спектра клітинних популяцій, в яких ключову роль відіграють стовбурові кроветворні клітини. Установлено зміну фенотипічних і функціональних характеристик КФП з пролонгацією терміну гестації, що виражалось в зниженні їх колонієутворюючого потенціалу, кількості CD34⁺- і одночасному збільшенні Mac-1⁺- і LFA-1⁺-клітин. Показано, що криоконсервування селективно збагачує КФП 18 днів гестації кроветворними попередниками з великим проліферативним потенціалом. Даний факт може бути визначальним в прояві їхнього терапевтичного ефекту.

Ключові слова: клітини фетальної печінки, криоконсервування, кроветворні попередники.

The capability of cryopreservation to modify structural and functional status of bioobject, including fetal liver cells (FLCs), may be applied for cell and tissue therapy optimisation. The efficiency of FLCs application is determined by the presence in them of a wide spectrum of cell populations, including hemopoietic stem cells. There has been established a change in phenotypic and functional characteristics of FLCs with gestation term prolongation, manifesting in a decrease in their colony-forming potential, CD34⁺ number and a simultaneous increase in Mac-1⁺ and LFA-1⁺ cells. Cryopreservation was shown as capable for a selective enrichment of 18 gestation day's FLCs by hemopoietic precursors with a high proliferative potential. This fact may be determining one in their therapeutic effect manifestation.

Key-words: fetal liver cells, cryopreservation, hemopoietic precursors.

Использование клеток фетальной печени (КФП) является одной из терапевтических стратегий, направленных на минимизацию развития многих патологических состояний. Эффективность трансплантации КФП обусловлена присутствием в них стволовых кроветворных элементов [10, 21]. Использование КФП при лечении аутоиммунных заболеваний основано на их способности корректировать не только гемопоэтическую, но и иммунокомпетентную сферу организма реципиента [7, 9]. В последнее время достаточно интенсивно изу-

Application of fetal liver cells (FLCs) is one of therapeutic strategies, directed to minimise the development of many pathological states. The efficiency of FLCs transplantation is stipulated by the presence in them of hemopoietic stem elements [10, 21]. FLCs application for autoimmune disease treatment is based on their capability to correct not only hemopoietic, but immune competent sphere of recipient's organism as well [7, 9]. Recently of quite intensive studying are the immunotropic and immunoregulatory potentials of hemopoietic precursors of

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, 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:
cryo@online.kharkov.ua

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 61015; tel.:+380 57 3733039, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

чаются иммуностропный и иммунорегуляторный потенциалы гемопоэтических предшественников разной степени зрелости из различных гемопоэтических „плацдармов” [5, 9, 10, 27]. Способность КФП ингибировать иммунные реакции в системах *in vivo* и *in vitro* не рестриктирована по антигенам главного комплекса гистосовместимости и реализуется без предварительного контакта с клетками (тканями) – мишенями [6].

Считается, что такой феномен обусловлен продукцией КФП биологически активных субстанций с супрессорной активностью [2, 10]. К факторам естественной иммунной супрессии относятся трансформирующий фактор роста β , оксид азота, эритроидный супрессорный фактор, простагландины и т. д. [2, 30, 31, 37]. Клетки, продуцирующие эти факторы, идентифицированы в тканях гемопоэтического „плацдарма” взрослых грызунов [25, 30], человека [37], а также в печени эмбрионов [31].

Кроме того, критерием обоснования применения клеточно-тканевых субстратов гемопоэтического „плацдарма” для лечения дисфункции иммунокомпетентной сферы является потенциальная возможность трансплантируемых стволовых кроветворных клеток (СКК) „реставрировать” иммунную систему реципиента через обновление собственного компартмента подобных клеток [5, 10]. Это свойство имеет непосредственное отношение к КФП, поскольку наиболее примитивные предшественники гемопоэза более склонны к реализации описанного потенциала. Необходимо обратить внимание на то, что даже среди КФП гемопоэтические предшественники существенно меняют свой структурно-функциональный статус на различных этапах гестационного периода [24, 27]. Наиболее потентными принято считать СКК ранних сроков гестации как у человека [19, 21], так и у экспериментальных животных [17, 24].

Криобиологические технологии зарекомендовали себя одним из важнейших компонентов аппликации клеточной и тканевой терапии в клинической практике. Вместе с тем криоконсервирование как способ модификации структурно-функционального статуса биообъекта, в том числе КФП, является одним из существенных моментов в этом направлении. В некоторых случаях терапевтический эффект криоконсервированного материала по ряду параметров превосходит таковой нативного [7, 8]. На основании экспериментальных исследований, касающихся криоконсервирования продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК), были высказаны предположения, которые подтверждают его возможность изменять компонентный состав клеточно-тканевых субстра-

different maturity degree from various hemopoietic “base area” [5, 9, 10, 27]. FLCs capability to inhibit *in vivo* and *in vitro* immune responses is not restricted by antigens of major histocompatibility complex and is realised with no preliminary contact with target cells (tissues) [6].

Such a phenomenon is considered as the stipulated one by FLCs production of biologically active substances with a suppressive activity [2, 10]. Transforming growth factor β , nitric oxide, erythroid suppressive factor, prostaglandins *etc.* are referred to the factors of natural immune suppression [2, 30, 31, 37]. Cells, producing these factors are identified in tissues of hemopoietic “base area” of adult rodents [25, 30], human [37], as well as embryonic liver [31].

In addition, the criterion for substantiating the application of cell-tissue substrates of hemopoietic “base area” to treat dysfunctions of immune competent sphere is a potential possibility of transplanted hemopoietic stem cells (HSCs) to “restore” a recipient’s immune system by renewing own compartment of similar cells [5, 10]. This property is of direct relevance to FLCs, since the most primitive hemopoietic precursors are more prone to the mentioned potential realisation. Of note is the fact, that even among FLCs the hemopoietic precursors significantly change their structural and functional status at different stages of gestation period [24, 27]. HSCs of early gestation terms both in human [19, 21] and experimental animals [17, 24] are considered as the most potent ones.

Cryobiological technologies proved their worth as ones of the most important component in applying cell and tissue therapy for clinical practice. However the cryopreservation as the way to modify a structural and functional status of bioobject, including FLCs, is one of the important moments in this direction. In some cases a therapeutic effect of cryopreserved material exceeds a native one by some parameters [7, 8]. Basing on the experiments, related to cryopreservation of the products of embryofetoplacental complex (PEFPC) we made some suggestions, confirming its capability to change a component composition of cell-tissue substrates and, in particular, to modify their structural and functional status [8, 12, 22].

The research was aimed to comparatively estimate a quantitative composition and functional potential of HSCs of fetal liver (FL) of different gestation terms prior to and after cryopreservation.

Materials and methods

Experiments were carried out in 22–24 g CBA/H mice of 12–14 week age. Mice were decapitated under light ether narcosis according to the international principles of the “European Convention for the Protec-

тов и, главное, модифицировать их структурно-функциональный статус [8, 12, 22].

Цель исследования – сравнительная оценка количественного состава и функционального потенциала СКК фетальной печени (ФП) разных сроков гестации до и после криоконсервирования.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на мышах линии СВА/Н 12–14-недельного возраста массой 22–24 г. Мышей декапитировали под легким эфирным наркозом в соответствии с Международными принципами “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Объектом исследования служили клетки фетальной печени 15-х (КФП-15) и 18-х (КФП-18) суток гестации, полученные на среде 199 с 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой и 2%-м цитратом натрия.

Содержание в популяции КФП CD34⁺, Mac-1⁺ – и LFA-1⁺ – клеток определяли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA), используя anti-mouse – моноклональные антитела CD34 (PE-конъюгаты; Abcam, США), Mac-1 (CD11a, FITC-конъюгаты; Biolegend, США) и LFA-1 (CD11b, FITC-конъюгаты; Biolegend, США). Статистический учет данных осуществляли с помощью программы WinMDI 2.8.

Содержание альфа-фетопroteина (АФП) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом на анализаторе Stat Fax 2100 (USA) с помощью набора реактивов фирмы “Протеиновый контур” (Санкт-Петербург).

Клетки фетальной печени криоконсервировали под защитой криопротектора ДМСО в концентрации 10% на программном замораживателе УОП-06 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) со скоростью 1°C/мин до –25°C с последующим погружением образцов в жидкий азот [8].

Оценку содержания колониеобразующих единиц (КОЕс) в ФП осуществляли *in vivo* методом селезеночного колониеобразования у летально облученных реципиентов на 8-е (КОЕс-8) и 12-е (КОЕс-12) сутки после трансплантации животным 1×10⁵ КФП/мышь по общепринятой методике [35]. Содержание предшественников грануломоноцитопоэза (КОЕ-ГМ) в системе *in vitro* определяли по количеству формируемых колоний (КОЕ) и кластеров (КЛОЕ) в полужидком агаре [14]. Их идентификацию в нативном материале осуществляли на 7-е, в криоконсервированном – на 14-е сутки культивирования, поскольку пролифера-

tion of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985).

Fetal liver cells of 15 and 18 gestation days (FLCs-15 and FLCs-18, correspondingly), procured with medium 199 with 10% embryonic calf serum and 2% sodium citrate, served the research object.

Content of CD34⁺, Mac-1⁺ and LFA-1⁺ cells in FLCs population was determined with FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) using anti-mouse MAT (Abcam): CD34 (PE) and Biolegend: Mac-1 (CD11a; FITC), LFA-1 (CD11b; FITC). Data were statistically processed with WinMDI 2.8 software.

Alpha-fetoprotein (AFP) content in blood serum was determined using immune-enzyme method by means of Stat Fax 2100 analyser (USA) with reagent kit of “Protein Contour” Ltd (Russia).

Fetal liver cells were cryopreserved under 10% DMSO protection with programmed freezer UOP-06 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine) with 1°C/min rate down to –25°C with following immersion into liquid nitrogen [8].

The content of colony-forming units (CFUs) in FL was *in vivo* assessed using the method of spleen colony-formation in lethally irradiated recipients to the 8th and 12th days (CFUs-8 and CFUs-12, correspondingly) after transplantation to animals of 1×10⁵ FLCs/mouse according to the standard technique [35]. Content of granulomonocytopoiesis precursors (CFU-GM) was determined *in vitro* by the number of formed colonies (CFU) and clusters (CIFU) in semisolid agar [14]. Their identification in native and cryopreserved materials was realised to the 7th and 14th days, correspondingly, because of a temporary inhibition of CFU-GM proliferative activity under cryopreservation factor effect [11]. Preparations were studied under inverted microscope (×40).

To assess the distribution peculiarities of hemopoietic cells of various differentiation extent [1] there was introduced the index of proliferative activity (IPA), representing the ratio of CFUs-12/CFUs-8 or CFU/CIFU [11].

The results obtained were statistically processed using the Student’s method with Excel software.

Results and discussion

Studying structural and functional characteristics of FLCs of different gestation terms. Taking into account the significance of FLCs heterogeneous composition in manifesting their therapeutic effect [10], there was recognised an unique role of certain cell populations, including hepatoblasts, similar to oval cells, liver hematopoietic stem cells [32]. Studying the FLCs morphological composition demonstrated the content

тивная активность КОЕ-ГМ временно ингибирована под действием факторов криоконсервирования [11]. Препараты исследовали под инвертированным микроскопом ($\times 40$).

Для оценки особенностей распределения кроветворных клеток различной степени дифференцировки [1] был введен индекс пролиферативной активности (ИПА), представляющий собой отношение КОЕс-12/КОЕс-8 или КОЕ/КЛОЕ [11].

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы MS Excel.

Результаты и обсуждение

Изучение структурно-функциональных характеристик КФП разных сроков гестации. Учитывая значимость гетерогенного состава КФП в проявлении их лечебного эффекта [10], признана уникальная роль определенных популяций клеток, в том числе гепатобластов, которые подобны овальным клеткам, печеночным гемопоэтическим стволовым клеткам [32]. Исследование морфологического состава КФП показало, что в КФП-15 содержание недифференцированных бластов составляло $8,70 \pm 1,20\%$. В КФП-18 этот показатель снижался почти в 1,5 раза на фоне увеличения содержания зрелых форм (табл. 1). Эти данные совпадают с результатами других авторов о максимальном содержании гепатобластов в ФП мышей с 12–13-х по 15–16-е сутки гестации и дальнейшем снижении их концентрации и гемопоэтического потенциала [29].

Известно, что кроветворные предшественники КФП при увеличении сроков гестации изменяют свои фенотипические характеристики и функциональный статус [21, 24]. Фактически это происходит при дифференцировке СКК ФП. Для идентификации среди КФП кроветворных предшест-

of non-differentiated blasts in FLCs-15 to make $8.70 \pm 1.20\%$. This index in FLCs-18 reduced almost in 1.5 times at the background of increased content of mature forms (Table 1). These data coincide with the results of other authors about the maximum hepatoblast content in murine FL since the 12–13th to 15–16th gestation days and further decrease in their concentration and hemopoietic potential [29].

FLCs hemopoietic precursors under gestation term rise are known as changing their phenotypic characteristics and functional status [21, 24]. Actually this occurs during fetal liver HSCs differentiation. In order to identify hemopoietic precursors among FLCs there are used different markers, namely CD34, Mac-1, Sca-1, Thy-1, CD117 etc. Their expression degree either as independent tracer, or combined with other membrane structures, characterises the level of precursor functional potential (differentiation degree) [24]. For example, with HSCs differentiation there is a decrease in expression degree of CD34 marker [19].

The research performed demonstrated almost twice decrease of CD34⁺ cell content in FL under gestation term rise (Fig. 1), that corresponded to the notions about the fact that in total HSCs compartment the ratio of pool of slightly differentiated cells with a high proliferative potential and those, advanced in differentiation, changed with gestation term increase [19].

The obtained results of comparative estimation of CD34⁺ cells and AFP quantitative content in mice of different gestation term demonstrated a high match of their change dynamics since 15th to 18th days (Fig. 1). In spite of the fact, that AFP concentration within this period reduced more intensively (in 5 times), the common tendency of changes in both indices might testify to the interdependence of AFP production and multipotent precursor content in embryogenesis.

Of known is the AFP regulatory role as for immune system, consisting in activation of immune suppressive

Таблица 1. Морфологический состав КФП-15 и КФП-18
Table 1. FLCs-15 and FLCs-18 morphological composition

Сроки гестации КФП, сутки FLC gestation terms, days	Морфологический состав КФП FLC morphological composition								
	Бласты Blasts				Мета-миелоциты Meta-myelocytes	Гранулоциты Granulocytes	Моноциты Monocytes	Лимфоциты Lymphocytes	Гепатоциты Hepatocytes
	Недиф. Non-dif.	Эритро- Erythro-	Нормо- Normo-	Миело- Myelo-					
15	8,7 \pm 1,2	29,0 \pm 2,8	46,30 \pm 3,02	2,8 \pm 0,80	1,90 \pm 0,80	1,10 \pm 0,25	2,0 \pm 0,4	1,20 \pm 0,01	7,30 \pm 0,50
18	6,10 \pm 0,33*	10,1 \pm 0,5	46,80 \pm 2,45	12,80 \pm 0,64*	1,00 \pm 0,01	3,40 \pm 0,20*	–	3,40 \pm 0,20*	18,50 \pm 0,94

Примечание: * – достоверные различия ($P < 0,05$) при сравнении с КФП-15; Недиф. – недифференцированные.

Notes: * – statistically significant differences ($P < 0.05$) compared to FLCs-15; Non-dif. – nondifferentiated.

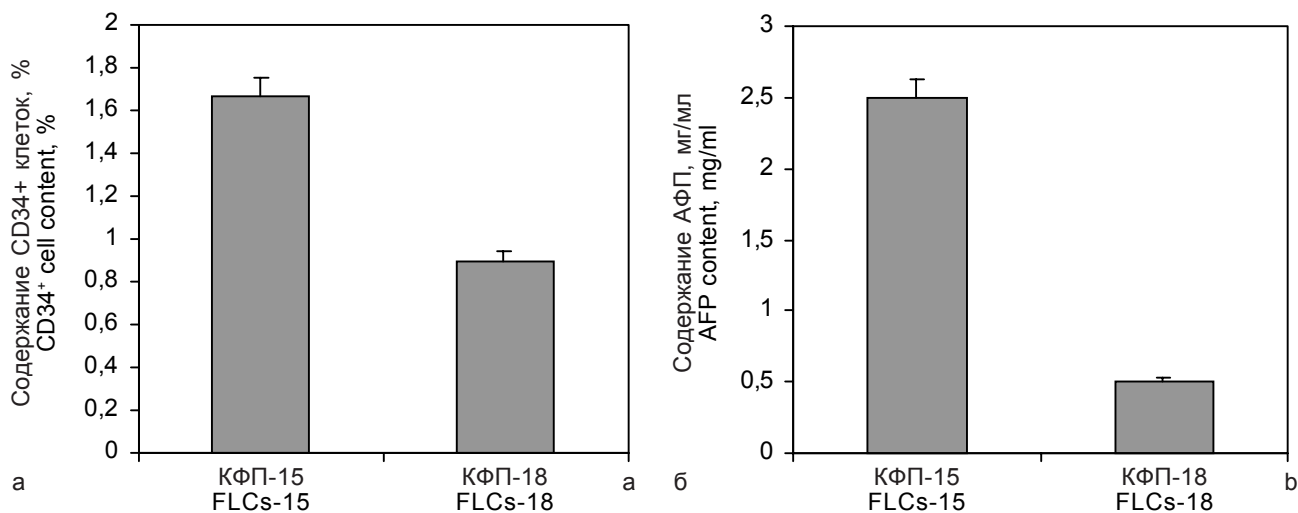


Рис. 1. Содержание CD34⁺-клеток (а) и АФП (б) на разных стадиях гестационного периода.

Fig. 1. CD34⁺ cells (a) and AFP (b) content at various gestation stages.

венников используют различные маркеры, а именно CD34, Mac-1, Sca-1, Thy-1, CD117 и т. д. Степень их экспрессии либо как самостоятельного свидетеля, либо в сочетании с другими мембранными структурами характеризует уровень функционального потенциала предшественников (степень дифференцировки) [24]. Например, по мере дифференцировки СКК снижается степень экспрессии CD34-маркера [19].

Проведенные исследования продемонстрировали почти двукратное снижение содержания CD34⁺-клеток в ФП при увеличении срока гестации (рис. 1). Это соответствует представлениям о том, что в общем компартменте СКК соотношение пула малодифференцированных, обладающих высоким пролиферативным потенциалом, и клеток, продвинутых в дифференцировке, изменяется при увеличении срока гестации [19].

Полученные результаты сравнительной оценки количественного содержания CD34⁺-клеток и АФП у мышей разного срока гестации показали высокую степень совпадения динамики их изменения с 15-х по 18-е сутки (рис. 1). Несмотря на то, что концентрация АФП в этот период снижалась более интенсивно (в 5 раз), общая тенденция изменения обоих показателей может свидетельствовать о взаимообусловленности продукции АФП и содержания мультипотентных предшественников в эмбриогенезе.

Известна регуляторная роль АФП в отношении иммунной системы, заключающаяся в активации супрессорного звена иммунитета и ингибции функции Т-эффекторов [13, 16]. Наши данные и результаты других авторов [18, 20, 23] подтверждают, что этот белок участвует в поддержании гемопоза в ФП и прежде всего в обеспечении функ-

link and T-effector function inhibition [13, 16]. Our data and results of other authors [18, 20, 23] confirm this protein participation in maintaining FL homeostasis and, mainly, in providing HSCs functional status.

Wide spectrum of FLCs biological activity is realised at the level of a direct intercellular cooperation or distant mediator interactions with participation of different adhesive molecules: Mac-1, LFA-1, ICAM-1, VCAM, L-selectin, VLA-4, VLA-5 *etc.* [36]. These molecules are identified and characterised as the structures, involved in regulating functional state primarily of leukocytes. Further, adhesive molecules of immunoglobulin family and production of chemokine series were shown as being inherent to many cells and participating in migration and settlement of stem cells in bone marrow microenvironment as well. In particular, Mac-1 as heterodimers of CD11b and CD18, is the member of integrin family. CD11b and CD18 represent adhesive molecules, playing an important role in multipotent HSCs interaction with bone marrow stroma [22, 28, 36]. One believes, that differences in Mac-1 expression on HSCs of adult BM and FL are related to a change in the spectrum of microenvironment signals [22, 24]. Mac-1⁺ hemopoietic precursors are assumed to be the most prone to proliferation, meanwhile their resting state is provided when this marker is absent [24]. With HSCs differentiation there is an increase in cell number and expression extent of adhesive molecules on their surface, including Mac-1 structure. Our own data, testifying to the fact, that the number of Mac-1⁺ cells in FL really augmented in 2.2 times with gestation term rise since 15th to 18th days, corresponded to this concept completely (Fig. 2).

The process of FLCs precursor progress from less to more differentiated ones during gestation term prolongation is confirmed by an increased concentration

ционального статуса СКК.

Широкий спектр биологической активности КФП реализуется на уровне непосредственной межклеточной кооперации или дистантных медиаторных взаимодействий с участием различных молекул адгезии: Mac-1, LFA-1, ICAM-1, VCAM, L-селектин, VLA-4, VLA-5 и др. [36]. Эти молекулы идентифицированы и охарактеризованы как структуры, задействованные в регуляции функционального состояния, в первую очередь лейкоцитов. В дальнейшем было показано, что молекулы адгезии семейства иммуноглобулинов и продукция ряда хемокинов присущи многим клеткам и участвуют также в миграции и расселении стволовых клеток в костномозговом микроокружении. В частности, Mac-1 в виде гетеродимеров CD11b и CD18 является членом семейства интегринов. CD11b и CD18 представляют собой молекулы адгезии, которые играют важную роль во взаимодействии мультипотентных СКК со стромой костного мозга (КМ) [22, 28, 36]. Существует мнение, что различия в экспрессии Mac-1 на СКК взрослого КМ и ФП связаны с изменением спектра сигналов микроокружения [22, 24]. Предполагается, что Mac-1⁺ – кроветворные предшественники в большей степени склонны к пролиферации, тогда как отсутствие этого маркера обеспечивает состояние их покоя [24]. По мере дифференцировки СКК увеличивается количество клеток и повышается степень экспрессии молекул адгезии на их поверхности, включая Mac-1 – структуру. В полном соответствии с данной концепцией находятся полученные нами данные, которые свидетельствуют, что количество Mac-1⁺ – клеток в ФП действительно повышалось при увеличении сроков гестации с 15-х по 18-е сутки в 2,2 раза (рис. 2).

Процесс продвижения предшественников КФП от менее к более дифференцированным при пролонгации срока гестации подтверждается и увеличением концентрации среди них LFA-1⁺ – клеток. Кратность увеличения их содержания была примерно в 1,5 раза меньшей, чем Mac-1⁺ – клеток, тем не менее она была очевидной (рис. 2). Известно, что LFA-1 – лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген – экспрессируется и на СКК [33, 34]. Широта его функционального потенциала достаточно велика, но ключевая роль – придание СКК (по мере созревания) способности взаимодействовать с эндотелиальными клетками микрососудов и формировать так называемую “миграционную пору” для выхода из ниши кроветворного микроокружения [26]. Поэтому логично считать, что увеличение концентрации LFA-1⁺ – КФП с 15-х по 18-е сутки (рис. 2) отражает и дина-

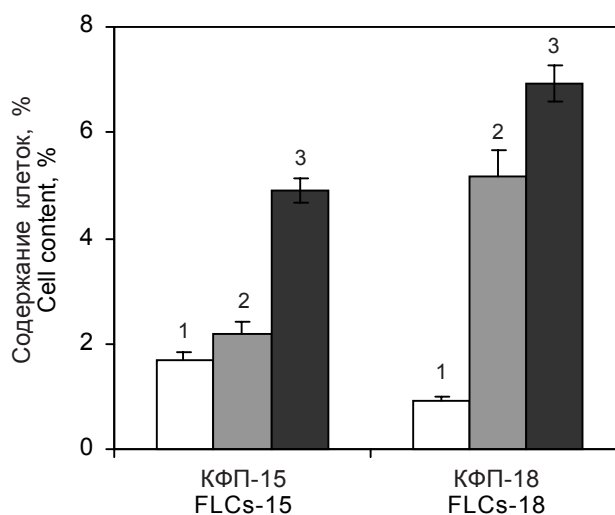


Рис. 2. Содержание CD34⁺ (1), Mac-1⁺ (2) и LFA-1⁺ (3) клеток в ФП в зависимости от срока гестации.

Fig. 2. Content of CD34⁺ (1), Mac-1⁺ (2) and LFA-1⁺ (3) cells in FL depending on gestation term.

of LFA-1⁺ cells among them. Magnification ratio of their content was 1.5 times lower than Mac-1⁺ cells, but evident (Fig. 2). The LFA-1, a lymphocytic functionally associated antigen is known as expressed on HSCs as well [33, 34]. The spread of its functional potential is quite a large, but the key role consists in making HSCs (with maturation) capable for interaction with endothelial cells of microvessels and forming so-called “migration pore” to release from a niche of hemopoietic microenvironment [26]. Therefore it is reasonable to believe, that an increase in LFA-1⁺ FLC content within the 15th to 18th days (Fig. 2) reflects the dynamics of change in LFA-1⁺ hemopoietic precursor content among them. So, by the results of assessment of FLCs phenotypic characteristics of selected gestation terms, the concentration of more potent hemopoietic precursors was established to be higher in FLCs-15. This correlated with the data of other authors [24], which demonstrated a sharp decrease in the concentration of hemopoietic multipotent precursors with a long-term potential of self-maintaining (LT-HSC) after 15th gestation day in FL.

This fact was confirmed when evaluating the functional status of FL hemopoietic precursors of different differentiation rate. Fig. 3 shows that FLCs did not possess a high colony forming activity *in vivo* independently on gestation term. However, a distinct redistribution of subpopulation composition of precursors when increasing the gestation term with a decrease in more potent CFUs-12 content, was traced. If comparing this result with FLCs phenotypic characteristics (see Fig. 2) we may note, that the similar dynamics was only in a change of CD34⁺ cell content. At this background there was an increase in the content of

мику изменения содержания среди них LFA-1⁺ – кроветворных предшественников. Итак, по результатам оценки фенотипических характеристик КФП выбранных сроков гестации установлено, что концентрация более потенциальных кроветворных предшественников была выше в КФП-15. Это согласуется с данными других авторов [24], которые показали, что после 15-х суток гестации в ФП резко снижается концентрация кроветворных мультипотентных предшественников с длительным потенциалом самоподдержания (LT-HSC).

Данный факт нашел свое подтверждение при оценке функционального статуса кроветворных предшественников ФП разного уровня дифференцировки. Из рис. 3 следует, что КФП не обладали высокой колониеобразующей активностью в системе *in vivo* независимо от срока гестации. Однако прослеживалось четкое перераспределение субпопуляционного состава предшественников при увеличении срока гестации со снижением содержания более потенциальных КОЕс-12. Сопоставляя этот результат с фенотипическими характеристиками КФП (см. рис. 2), можно заметить, что такую же динамику имело лишь изменение содержания CD34⁺-клеток. На этом фоне увеличивалось содержание более дифференцированных КОЕс-8, что совпадало с повышением концентрации в КФП Mac-1⁺ – и LFA-1⁺ – клеток и снижением ИПА. Подобное изменение прослеживалось при оценке *in vitro* содержания образующих колонии в агаре КОЕ-ГМ, еще более дифференцированных, чем КОЕс-8 – кроветворных предшественников (рис. 4). К 18-м суткам достоверно снижалась концентрация более потенциальной субпопуляции КОЕ. Содержание дифференцированных КЛОЕ изменялось недостоверно.

Итак, изменение фенотипических и функциональных характеристик КФП по мере увеличения срока гестации очевидно. Возникает вопрос: влияют ли такого рода изменения на устойчивость КФП к факторам криоконсервирования, ответ на который представлен ниже.

Оценка характера влияния факторов криоконсервирования на КФП разных сроков гестации. Результаты данного исследования подтверждают основные постулаты криобиологии: характер и степень влияния физико-химических факторов, реализуемых в процессе криоконсервирования, определяются исходным состоянием биообъекта [4, 15].

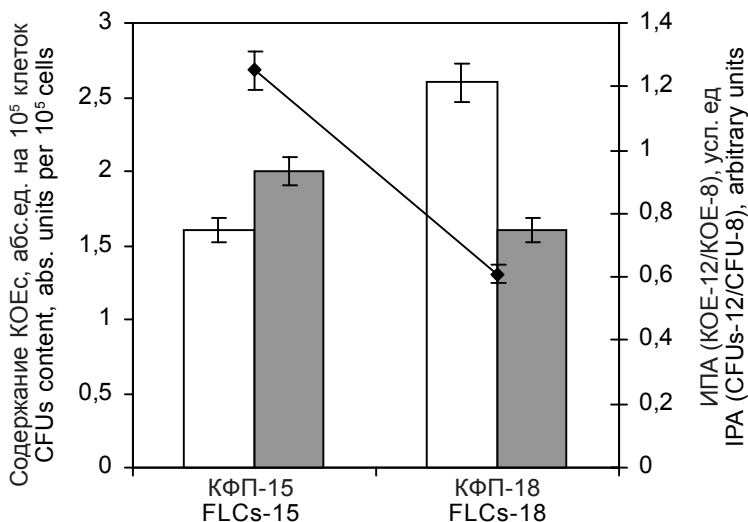


Рис. 3. Колониеобразующий потенциал КОЕс фетальной печени разных сроков гестации. □ – КОЕс-8; ■ – КОЕс-12; ◆ – ИПА.

Fig. 3. Colony forming potential of fetal liver CFUs of different gestation terms. □ – CFUs-8; ■ – CFUs-12; ◆ – IPA.

more differentiated CFUs-8, coinciding with augmentation of Mac-1⁺ and LFA-1⁺ cell concentration in FLCs as well as the IPA reduction. The same change was traced when assessing *in vitro* the content of CFU-GM, forming the colonies in agar, much more differentiated, than CFUs-8 of hemopoietic precursors (Fig. 4). To the 18th day there was a statistically significant decrease in the concentration of more potent CFU subpopulation. Change in the content of differentiated CFU was not statistically significant.

Thus, a change in phenotypic and functional characteristics of FLCs with gestation term rise is evident. The question about the fact whether such changes affect the FLCs resistance to cryopreservation factors, is answered below.

Assessment of effect character of cryopreservation factors on FLCs of different gestation terms. The results of the study confirm the main cryobiological postulates: the character and degree of the effect of physical and chemical factors, realised during cryopreservation, are determined by the initial state of the biological object [4, 15].

Really, a morphological composition of FLCs of different gestation terms, having the certain differences before cryotreatment, was much more manifested after cryopreservation (Table 2). In particular, if the change in a number of non-differentiated blasts in cryopreserved FLCs-15 (cFLCs-15) was insignificant, it increased by 26% in cFLCs-15. More manifested changes in content of myeloblasts, lymphocytes, mature hepatocytes *etc.* in cFLCs-18 are also evident. Considerable differences were traced when evaluating the integrity and number of nucleated cells after FLCs cryopreservation (Fig. 5). These indices for cFLCs-15 reduced not

Таблица 2. Морфологический состав КФП-15 и КФП-18 до и после криоконсервирования
Table 2. Morphological composition of FLCs-15 and FLCs-18 prior to and after cryopreservation

Клетки фетальной печени Fetal liver cells	Морфологический состав КФП FLC morphological composition								
	Бласты Blasts				Мета- миелоциты Meta- myelocytes	Грануло- циты Granulo- cytes	Моно- циты Mono- cytes	Лимфо- циты Lympho- cytes	Гепато- циты Hepato- cytes
	Недиф. Non-dif.	Эритро- Erythro-	Нормо- Normo-	Миело- Myelo-					
КФП-15 FLCs-15									
Нативные Native	8,70±1,20	29,00±2,80	46,30±3,02	2,80±0,80	1,90±0,80	1,10±0,25	2,00±0,40	1,20±0,40	7,30±0,50
Криоконсер- вированные Cryopreserved	10,5±1,2	28,0±2,0	57,20±4,30*	1,20±0,01	–	–	1,20±0,01	2,20±0,40*	–
КФП-18 FLCs-18									
Нативные Native	6,10±0,33	10,10±0,50	46,80±2,45	12,80±0,64	1,00±0,01	3,40±0,20	–	3,40±0,20	18,50±0,94
Криоконсер- вированные Cryopreserved	7,70±0,40* [#]	11,70±0,64 [#]	46,50±2,23 [#]	4,50±0,22* [#]	–	2,20±0,13*	–	15,70±0,84* [#]	9,80±0,51*

Примечание: * – достоверные различия ($P < 0,05$) между группами: нативные КФП-15 с криоконсервированными КФП-15 или нативные КФП-18 с криоконсервированными КФП-18; [#] – криоконсервированные КФП-15 с криоконсервированными КФП-18; Недиф. – недифференцированные.

Notes: * – statistically significant differences ($P < 0.05$) between groups: [#] – is nFLCs-15 with cFLCs-15 or nFLCs-18 with cFLCs-18; Non-dif. – nondifferentiated.

Действительно, морфологический состав КФП разных сроков гестации, имея определенные отличия до криообработки, еще в большей степени манифестировался после криоконсервирования (табл. 2). В частности, если количество недифференцированных бластов в криоконсервированных КФП-15 (кКФП-15) изменялось несущественно, то в кКФП-18 повышалось на 26%. Очевидны также более выраженные изменения в кКФП-18 содержания миелобластов, лимфоцитов, зрелых гепатоцитов и т. д. Значительные различия прослеживались при оценке сохранности и количества ядросодержащих клеток после криоконсервирования КФП (рис. 5). Эти показатели для кКФП-15 снижались не более чем на 10%, подчеркивая “оптимальность” выбранного режима криоконсервирования. Менее “комфортным” этот режим был для КФП-18, при котором количество сохраненных и ядросодержащих клеток было на уровне не выше 55–65% от контроля.

Исследование фенотипических маркеров также показало, что один и тот же режим криоконсервирования по-разному

more than by 10%, by emphasising the “optimal” way of selected cryopreservation regimen. This regimen was less “comfortable” for FLCs-18, when the number of integral and nucleated cells was at the level not higher than 55–65% of the control.

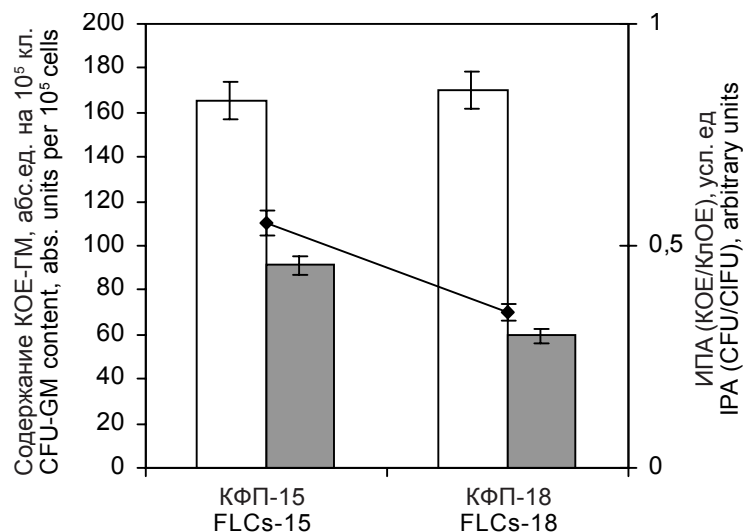


Рис. 4. Колониеобразующий потенциал КОЕ-ГМ фетальной печени разных сроков гестации: □ – КлОЕ; ■ – КОЕ; ◆ – ИПА.

Fig. 4. Colony forming potential of fetal liver CFU-GM of different gestation terms: □ – C1FU; ■ – CFU; ◆ – IPA.

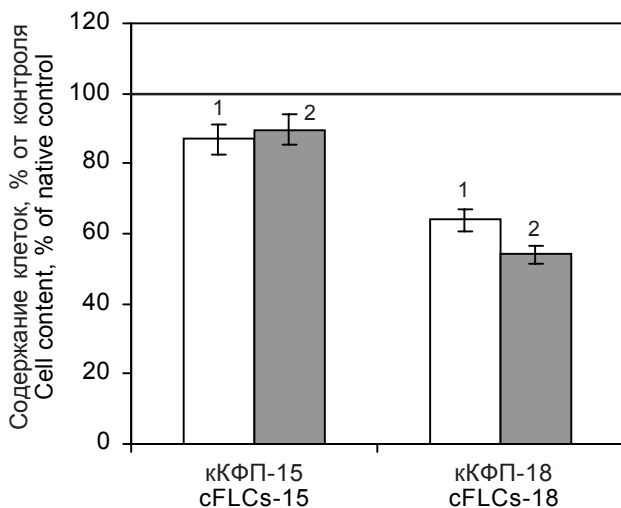


Рис. 5. Количество сохранных (1) и ядросодержащих (2) клеток в криоконсервированной ФП разных сроков гестации (за 100% принято их количество в нативном материале каждого срока гестации соответственно).

Fig. 5. Number of integral (1) and nucleated (2) cells in cryopreserved FL of different gestation terms (for 100% we assumed their number in native material of each gestation term, correspondingly).

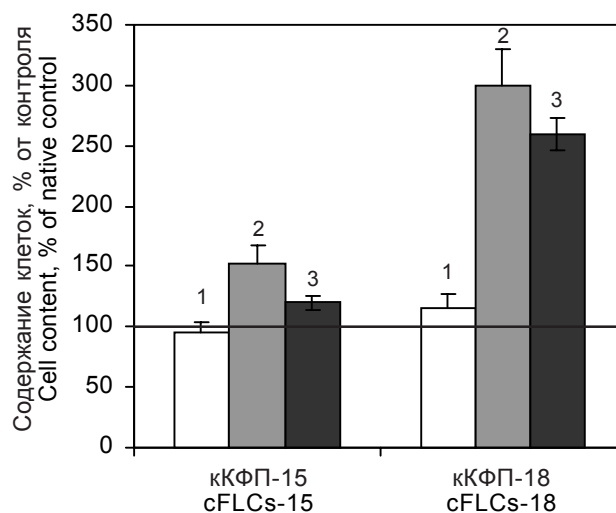


Рис. 6. Содержание CD34⁺ (1), Mac-1⁺ (2) и LFA-1⁺ (3) клеток в криоконсервированной ФП в зависимости от срока гестации (за 100% принято их количество в нативном материале каждого срока гестации соответственно).

Fig. 6. Content of CD34⁺ (1), Mac-1⁺ (2) LFA-1⁺ (3) cells in cryopreserved FL depending on gestation term (for 100% we assumed their number in native material of each gestation term, correspondingly).

влиял на содержание “клеток-кандидатов” в кроветворные предшественники среди КФП разных сроков гестации (рис. 6). Так, в кКФП-15 показатель содержания CD34⁺-клеток достоверно не отличался от нативного контроля. В кКФП-18 содержание CD34⁺-клеток увеличивалось на 16%, что согласуется со схожим увеличением субпопуляции недифференцированных бластов. Такое повышение вполне может быть обусловлено относительным их увеличением на фоне почти двукратного снижения количества ядросодержащих клеток: миелобластов, метамиелоцитов, гранулоцитов и гепатоцитов (табл. 2). Нельзя также исключить того, что относительное увеличение содержания CD34⁺-клеток в кКФП-18 связано с селективным повышением концентрации лимфоцитов, морфологию которых ассоциируют с определенными субпопуляциями кроветворных предшественников [3].

Показатели содержания Mac-1⁺ – и LFA-1⁺ – клеток в кКФП-18, в отличие от кКФП-15 (рис. 6), увеличивались, превосходя контроль в 2,5-3 раза. Важно заметить, что более выраженное повышение концентрации Mac-1⁺ – и LFA-1⁺ – клеток происходило в той ФП, которая уже в нативном виде содержала их значительно больше, т. е. в КФП-18 (см. рис. 2). Это увеличение явно не соизмеримо с перераспределением клеток за счет гибели ядерных элементов. По-видимому, в ФП 18-х суток гестации присутствуют клетки, “предрасположенные” к активации экспрессии этих мар-

Study of phenotypic markers also demonstrated the fact, that the same cryopreservation regimen differently affected the content of cells being a “candidates” for hemopoietic precursors among FLCs of different gestation terms (Fig. 6). So, the index of CD34⁺ cell content in cFLCs-15 did not statistically and significantly differ from the native control. The content of CD34⁺ cells in cFLCs-18 augmented by 16%, that correlated to the similar increase in subpopulation of non-differentiated blasts. Such an increase may be fully stipulated by their relative augmentation at the background of almost twice decrease in a number of nucleated cells: myeloblasts, metamyelocytes, granulocytes and hepatocytes) (Table 2). We can not also exclude the fact, that a relative rise of CD34⁺ cell content in cFLCs-18 is related to a selective augmentation of lymphocyte concentration, which morphology is associated to the certain subpopulations of hemopoietic precursors [3].

Indices of Mac-1⁺ and LFA-1⁺ cell content in cFLCs-18, in contrast to cFLCs-15, were augmented, exceeding the control by 2.5–3 times. Of importance is to note the fact, that more manifested increase in Mac-1⁺ and LFA-1⁺ cell content occurs in that FL, which even in native state comprised them in much higher quantity, *i. e.* in FLCs-18 (see Fig. 2). This augmentation is not clearly comparable with cell content redistribution due to death of nucleated elements. Fetal liver of 18 gestation days appear to comprise the cells, being “liable” for undergoing the activation of the expression of these markers under the effect of

керов под действием факторов криоконсервирования. Вероятность реализации такого предположения базируется на концепции о возможности ревертации под действием факторов криоконсервирования функционального потенциала КФП поздних сроков гестации до уровня более ранних сроков.

Учитывая также факт экспрессии указанных маркеров на определенных формах СКК, возникает вопрос, не сопровождается ли такое повышение концентрации Mac-1⁺ – (как и LFA-1⁺ –) клеток после криоконсервирования обогащением общей популяции КФП-18 кроветворными предшественниками. Представленные на рис. 7 и 8 результаты не дают, однако, однозначного ответа на этот вопрос. Так, после криоконсервирования наблюдалось снижение интегрального потенциала колониеобразования КФП-15, т. е. и КОЕс, и КОЕ-ГМ. При этом степень снижения примерно в равной мере содержания предшественников разного уровня дифференцировки превосходила показатели снижения сохранности КФП этого срока гестации. Более того, она не совпадала и со степенью снижения содержания CD34⁺-клеток (см. рис. 5).

Несколько иная картина наблюдалась после криоконсервирования КФП-18. В данном случае прослеживалось четкое перераспределение субпопуляций предшественников. На фоне снижения колониеобразующей активности КОЕс-8 и КОЕ-ГМ повышалось содержание КОЕс-12, которое в процентном выражении совпадало с повышением концентрации только CD34⁺-, но не Mac-1⁺– и LFA-1⁺– клеток (рис. 6–8).

Эти результаты свидетельствуют о том, что криоконсервирование индуцирует экспрессию структур Mac-1 и LFA-1 не на кроветворных предшественниках КФП-18, по крайней мере тех, функциональный статус которых аттестовался указанными методами. Другими словами, появляющиеся после криоконсервирования КФП-18 дополнительные фракции Mac-1⁺– и LFA-1⁺– клеток не являются кроветворными предшественниками. Хотя очевидно, что криоконсервирование вызывает перераспределение клеточных субпопуляций за счет придания новых качественных свойств КФП, индуцируя, например, экспрессию на них маркеров CD34, Mac-1 и LFA-1. При этом важен факт более выраженных в КФП-18 такого рода модификаций. Существенно также, что в разной степени выраженная после криоконсервирования для разных сроков гестации КФП “супер-

cryopreservation factors. The probability of realisation of such a supposition is based on the concept about a possible revert of functional potential of late gestation term FLCs back to the level of earlier terms under cryopreservation factors.

Taking into account the fact of expression of mentioned markers on certain types of HSCs, the question arises if such an increase in concentration of Mac-1⁺ (as well as LFA-1⁺) cells after cryopreservation is accompanied by enrichment of FLCs-18 total population with hemopoietic precursors. The results, presented in Fig. 7 and 8 do not clarify this. For example after cryopreservation a decrease in the integral potential of colony formation of FLCs-15, *i. e.* both CFUs and CFU-GM, was observed. At the same time the extent of decrease in the content of precursors of different differentiation level similarly exceeds the values of decrease in integrity of FLCs of this gestation term. In addition, it did not coincide with a decrease extent of CD34⁺ cell content as well (see Fig. 5).

Slightly different situation was observed after FLCs-18 cryopreservation. In this case a distinct redistribution of precursor subpopulations was traced. At the back-ground of a decrease in FCUs-8 and CFU-GM colony forming activity there was an increase in CFUs-12 content, coinciding in percentage with a concentration rise of only CD34⁺, but not Mac-1⁺ and LFA-1⁺ cells (Fig. 6–8).

These results testify to the fact, that cryopreservation induces the expression of Mac-1 and LFA-1

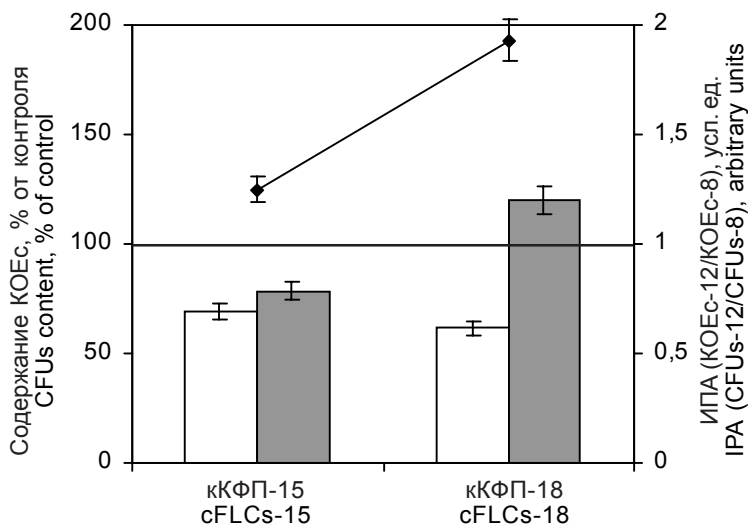


Рис. 7. Колониеобразующий потенциал КОЕс фетальной печени разных сроков гестации после криоконсервирования (за 100% принято количество колоний, образованных КОЕс нативного материала каждого срока гестации; за 1 – соответственно ИПА): □ – КОЕс-8; ■ – КОЕс-12; ◆ – ИПА.

Fig. 7. Colony forming potential of fetal liver CFUs of different gestation terms after cryopreservation (for 100% we assumed the number of colonies, formed by CFUs of native material of each gestation term; for 1 we did IPA, correspondingly): □ – CFUs-8; ■ – CFUs-12; ◆ – IPA.

экспрессия” клеток с указанными маркерами не коррелировала (за исключением CD34 и КОЕс-12 среди КФП-18) с изменением колониеобразующей активности КФП в системах *in vivo* и *in vitro*. Данный факт свидетельствует о том, что СКК могут экспрессировать маркеры Mac-1 и LFA-1, но не все Mac-1⁺ – или LFA-1⁺ – клетки являются кроветворными предшественниками. Подобный вывод был нами сделан и в отношении CD34-маркера. К тому же для нативного материала только по двум из трех маркеров характер изменения содержания клеток по срокам гестации совпадал с изменением колониеобразующей активности КФП: *in vivo* – CD34 с КОЕс-12 и Mac-1 с КОЕс-8; *in vitro* – CD34 с КОЕ.

Выводы

Установлено изменение фенотипических и функциональных характеристик КФП с увеличением срока гестации, что выражалось в снижении количества CD34⁺-клеток и их колониеобразующего потенциала в системах *in vivo* и *in vitro* с одновременным увеличением количества Mac-1⁺ – и LFA-1⁺ – клеток. На примере КФП с измененным исходным состоянием в зависимости от срока гестации показана способность факторов криоконсервирования модифицировать структурно-функциональное состояние различных клеточных компартов. Установлено, что криоконсервирование способно проявлять эффект селективного обогащения КФП-18 клетками с фенотипическими признаками кроветворных предшественников.

Полученные результаты являются основанием для исследования в дальнейшем особенностей терапевтического потенциала криоконсервированных КФП разных сроков гестации.

structures in cells not being the hemopoietic precursors of FLCs-18, at least those, which functional status was attested by the mentioned methods. By other words, additional fractions of Mac-1⁺ and LFA-1⁺ cells, appearing after cryopreservation, are not hemopoietic precursors. Although it is evident, that cryopreservation causes redistribution of cell subpopulations due to conferring the new qualitative properties to FLCs, by inducing, for example, the expression of CD34, Mac-1 and LFA-1 markers on them. At the same time of importance is the fact that such modifications are more manifested in FLCs-18. It is also important, that this “super expression” of mentioned markers in cells was differently manifested after cryopreservation for FLCs of various gestation terms, but did not correlate (excluding CD34 and CFUs-12 among FLCs-18) with changes of *in vivo* and *in vitro* colony forming activity of the FLCs. This fact testifies that the HSCs may express Mac-1 and LFA-1 markers, but not all Mac-1⁺ or LFA-1⁺ cells are hemopoietic precursors. The similar observation was made for CD34 marker. Furthermore the native cells showed the coincidence in character of changes in cell content *vs.* gestation terms and changes in FLC colony forming activity only for two of three markers: *in vivo* these are CD34 with CFUs-12 and Mac-1 with CFUs-8; *in vitro* – CD34 with CFU.

Conclusions

The investigation showed the changes in FLC phenotypic and functional characteristics due to elongation of gestation terms, that was manifested in the decrease in CD34⁺ cell content and *in vivo* and *in vitro* colony forming potential with a simultaneous increase in cell content and expression rate of Mac-1 and LFA-1 molecules. In the case of FLCs with changed initial state due to gestation term there was

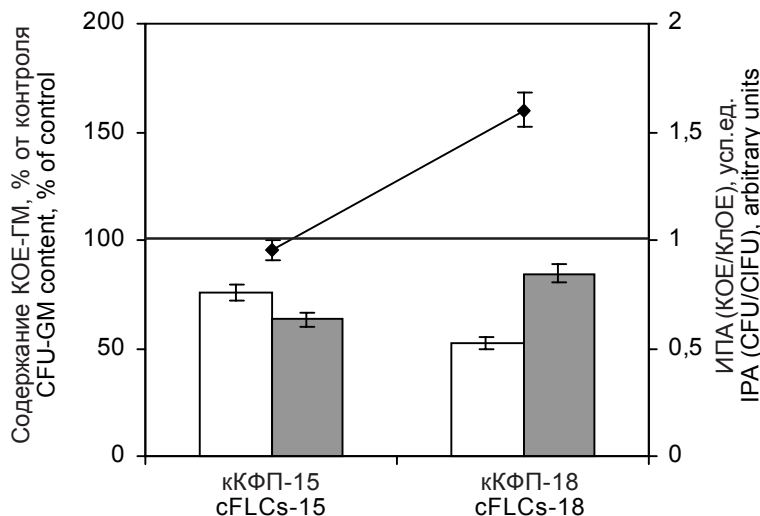


Рис. 8. Колониеобразующий потенциал КОЕ-ГМ фетальной печени разных сроков гестации после криоконсервирования (за 100% принято количество колоний, образованных КОЕс нативного материала каждого срока гестации; за 1 – соответственно ИПА): □ – КлОЕ; ■ – КОЕ; ◆ – ИПА.

Fig. 8. Colony forming potential of fetal liver CFU-GM of different gestation terms after cryopreservation (for 100% we assumed the number of colonies, formed by CFUs of native material of each gestation term; for 1 we did IPA, correspondingly): □ – CFU; ■ – CFU; ◆ – IPA.

Литература

1. Афанасьев Б.В., Алмазов В.А. Родоначальные кроветворные клетки человека: физиология и патология.– Л.: Наука, 1985.– 204с.
2. Бельский Ю.П., Данилец М.Г., Бельская Н.В. Роль оксида азота в иммуносупрессорной и противоопухолевой активностях клеток эмбриональной печени // Бюллетень СО РАМН.– 2005.– № 2.– С. 75–78.
3. Бутенко З.А., Зак К.П. Достижения и трудности морфологической идентификации стволовых кроветворных клеток // Стволовые и иммунокомпетентные клетки в норме и при опухолевом росте.– Киев: Наукова думка, 1981.– С. 70–81.
4. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Мембранные структуры, определяющие фенотипические характеристики и функциональное состояние кроветворных клеток; возможная их модификация под действием факторов криоконсервирования. Часть I // Пробл. криобиологии.– 1995.– №3.– С. 19–30.
5. Гольцев А.Н. Изучение патофизиологических механизмов проявления иммунореактивности гемопоэтической ткани // Пробл. криобиологии.– 1997.– №2.– С. 37–41.
6. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г. и др. Экспериментальное обоснование возможности применения продуктов фетоплацентарного комплекса (ПФПК) для лечения аутоиммунных заболеваний // Иммунология та алергологія.– 1999.– №3.– С. 47.
7. Гольцев А.Н., Рассоха И.В., Луценко Е.Д. и др. Межклеточные взаимодействия в иммунокомпетентной сфере при ревматоидном артрите после применения гемопоэтических клеток эмбриональной печени // Пробл. криобиологии.– 2003.– №3.– С. 45–53.
8. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Бабенко Н.Н. и др. Модификация структурно-функциональной организации стволовых кроветворных клеток костного мозга после действия факторов низкотемпературного консервирования // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 362–366.
9. Горская А.Ю., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Особенности проявления модулирующей активности клеток эмбриональной печени на лимфогемопоэтическом комплексе мышей с аутоиммунной гемолитической анемией // Пробл. криобиологии.– 2003.– №2.– С. 31–37.
10. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. криобиологии.– 2002.– №1.– С. 54–84.
11. Дубрава Т.Г. Эффективность криоконсервирования кроветворных клеток в зависимости от их исходных свойств: Автореф. дис...канд. биол. наук.– Харьков, 1986.– 14 с.
12. Козлова Ю.О. Вивчення впливу факторів криоконсервування на клітини гемопоетичної системи в умовах розвитку аутоімунних захворювань: Автореф. дис... канд. біол. наук.– Харків, 2005.– 19 с.
13. Черешнев В.А., Хаитов Р.М., Сидорович И.Г., Родионов С.Ю. Влияние α -фетопротеина человека на иммунореактивность при трансплантации тканей в эксперименте // Иммунология.– 2003.– №6.– С. 330–332.
14. Шерешков С.И. Культивирование гемопоэтических клеток на полутвердых питательных средах // Лаб. дело.– 1974.– №3.– С. 146–150.
15. Anderson E.M., Jones D.R.E., Liu D.T.Y., Evans A.A. Gestation age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal HPC preparations // Fetal Diagn. & Ther.– 1996.– Vol. 11, N6.– P. 427–432.
16. Bartha J.I., Romero-Carmona R., Comino-Delgado R. et al. Alpha-fetoprotein and hematopoietic growth factors in amniotic fluid // Obstetrics and Gynecology.– 2000.– Vol. 96, N4.– P. 588–592.

shown the capability of cryopreservation factors to modify structural and functional state of different cell compartments. Cryopreservation was established as capable to manifest the effect of selective enrichment of FLCs-18 with the cells having phenotypic signs of hemopoietic precursors.

The results obtained are the reason for further research of peculiarities of therapeutic potential of cryopreserved FLCs of different gestation terms.

References

1. Afanasiev B.V., Almazov V.A. Human germline hemopoietic cells: physiology and pathology.– Leningrad: Nauka, 1985.– 204 p.
2. Belsky Yu.P., Danilets M.G., Belskaya N.V. Role of nitrogen oxide in immune suppressive and anti-tumour activity of embryonic liver cells // Bull. of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences.– 2005.– N2.– P. 75–78.
3. Butenko Z.A., Zak K.P. Achievements and difficulties of morphological identification of hemopoietic stem cells // Stem and immune competent cells in norm and under tumour growth.– Kiev: Nauk. dumka, 1981.– P. 70–81.
4. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankova L.V. et al. Membrane structures, determining phenotypical characteristics and functional state of hemopoietic cells; their possible modification under the action of cryopreservation factors. Part II // Problems of Cryobiology.– 1995.– N3.– P. 19–30.
5. Goltsev A.N. Study of pathophysiological mechanisms of immunoreactivity manifestation of hemopoietic tissue // Problems of Cryobiology.– 1997.– N2.– P. 37–41.
6. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dubrava T.G. et al. Experimental substantiation of a possible application of products of fetoplacental complex (PFPC) to treat autoimmune diseases // Immunologiya ta Alergologiya.– 1999.– N3.– P. 47.
7. Goltsev A.N., Rassokha I.V., Lutsenko E.D. et al. Intercellular interactions in immunocompetent sphere at rheumatoid arthritis following the application of hematopoietic embryonic liver cells // Problems of Cryobiology.– 2003.– N3.– P. 45–53.
8. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Babenko N.N. et al. Modification of structural and functional organisation of stem hemopoietic cells of bone marrow after the effect of factors of low temperature preservation // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 362–366.
9. Gorskaya A.Yu., Lutsenko E.D., Ostankova L.V. et al. Peculiarities of modulating activity manifestation of embryonic liver cells on murine lymphohemopoietic complex with autoimmune hemolytic anemia // Problems of Cryobiology.– 2003.– N2.– P. 31–37.
10. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application // Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P. 54–84.
11. Dubrava T.G. Efficiency of hemopoietic cell cryopreservation depending on their initial properties: Author's abstract of thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 1986.– 14p.
12. Kozlova Yu.A. Study of effect of cryopreservation factors on hemopoietic system cells under development of autoimmune diseases: Author's abstract of thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 2005.– 19 p.
13. Chereshev V.A., Khaitov R.M., Sidorovich I.G., Rodionov S.Yu. Effect of human α -fetoprotein on immune reactivity under tissue transplantation in experiment // Immunologiya.– 2003.– N6.– P. 330–332.
14. Shereshkov S.I. Culturing of hemopoietic cells on semisolid nutrient media // Lab. Delo.– 1974.– N3.– P. 146–150.

17. *Ema H., Nakauchi H.* Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo // *Blood.*– 2000.– Vol. 95, N7.– P. 2284–2288.
18. *Emoto M., Kaufmann S.H.* Establishment characterization and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes // *Trends Immunol.* – 2003. – Vol. 24, N7.– P. 364–369.
19. *Frans T.H. Lim., Humphrey H.H., Frederic J.H.* Characterization of the human CD 34⁺ hematopoietic progenitor cell compartment during the second trimester of pregnancy // *Haematologica.*–2005.– Vol. 90, N2.– P. 173–179.
20. *Freitas I., Fracchiolla S., Baronzio G. et al.* Stem cell recruitment and liver de-differentiation in MMTV-neu (ErbB-2) transgenic mice // *Anticancer Res.*– 2003.– Vol. 23, N5.– P. 3783–3794.
21. *Gilles J.M., Divon M.Y., Bentolia E. et al.* Immunophenotypic characterization of human fetal liver hematopoietic stem cells during the midtrimester of gestation // *Am. J. Obstet.*– 1997.– Vol. 177, N3.– P. 619–625.
22. *Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al.* Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation // *International Journal of Refrigeration.*– 2006.– Vol. 29, N3.– P. 358–367.
23. *Lazaro C.A., Croager E.J., Mitchell C. et al.* Liver NKT cells: an account of heterogeneity // *Hepatology.*– 2003.– Vol. 38, N4.– P. 333–362.
24. *Morrison S.J., Hemmati H.D., Wandycz A.M., Weissman I.L.* The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1995.– Vol. 92, N22.– P. 10302–10306.
25. *Phillips R.L., Ernst R.E., Brunk B. et al.* The genetic program of hematopoietic stem cells // *Science.*– 2000.– Vol. 288, N5471.– P. 1635–1640.
26. *Prosper F., Stroncek D., McCarthy J. B. et al.* Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha 4 beta 1 integrin expression and function // *J. Clin. Invest.*– 1998.– Vol. 101, N11.– P. 2456–2467.
27. *Roy V., Miller J.S., Verfaillie C.M.* Phenotypic and functional characterization of committed and primitive myeloid and lymphoid hematopoietic precursors in human fetal liver // *Exp. Hematol.*– 1997.– Vol. 25, N5.– P. 387–394.
28. *Roy V., Verfaillie C.M.* Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: implication for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis // *Exp. Hematol.*– 1999.– Vol. 27, N2.– P. 302–312.
29. *Sasaki K., Sonoda Y.* Histometrical and three-dimensional analysis of liver hematopoiesis in the mouse embryo // *Arch. histol.* – 2000.–Vol. 63, N2.– P.137–146.
30. *Stopka T., Zivny J.H., Stopkova P. et al.* Human hematopoietic progenitors express erythropoietin // *Blood.*– 1998.– Vol. 91, N10.– P. 3766–3772.
31. *Surbek D.V., Steinman C., Burk M. et al.* Developmental changes in adhesion molecule expression in umbilical cord blood CD 34⁺ hematopoietic progenitor and stem cells // *Am. J. Obstet. Gynecol.*– 2000.– Vol. 183, N5.– P. 1152–1157.
32. *Suzuki A., Zheng Y., Kaneko S. et al.* Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver // *J. Cell Biol.*– 2002.– Vol. 156, N1.– P. 173–184.
33. *Tavassoli M., Hardy C.L.* Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells // *Blood.* – 1990. – Vol. 76, N6.– P. 1059.
34. *Teixido J., Hemier M.E., Greenberg J.S., Ankelesaria P.* Role of β_1 and β_2 integrins in the adhesion of human CD 34^{hi} stem cells to bone marrow stroma // *J. Clin. Invest.*–1992.– Vol. 90, N2.– P. 358–367.
35. *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.
15. *Anderson E.M., Jones D.R.E., Liu D.T.Y., Evans A.A.* Gestation age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal HPC preparations // *Fetal Diagn. & Ther.*– 1996.– Vol. 11, N6.– P. 427–432.
16. *Bartha J.I., Romero-Carmona R., Comino-Delgado R. et al.* Alpha-fetoprotein and hematopoietic growth factors in amniotic fluid // *Obstetrics and Gynecology.*– 2000.– Vol. 96, N4.– P. 588–592
17. *Ema H., Nakauchi H.* Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo // *Blood.*– 2000.– Vol. 95, N7.– P. 2284–2288.
18. *Emoto M., Kaufmann S.H.* Establishment characterization and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes // *Trends Immunol.* – 2003. – Vol. 24, N7.– P. 364–369.
19. *Frans T.H. Lim., Humphrey H.H., Frederic J.H.* Characterization of the human CD 34⁺ hematopoietic progenitor cell compartment during the second trimester of pregnancy // *Haematologica.*–2005.– Vol. 90, N2.– P. 173–179.
20. *Freitas I., Fracchiolla S., Baronzio G. et al.* Stem cell recruitment and liver de-differentiation in MMTV-neu (ErbB-2) transgenic mice // *Anticancer Res.*– 2003.– Vol. 23, N5.– P. 3783–3794.
21. *Gilles J.M., Divon M.Y., Bentolia E. et al.* Immunophenotypic characterization of human fetal liver hematopoietic stem cells during the midtrimester of gestation // *Am. J. Obstet.*– 1997.– Vol. 177, N3.– P. 619–625.
22. *Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al.* Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation // *International Journal of Refrigeration.*– 2006.– Vol. 29, N3.– P. 358–367.
23. *Lazaro C.A., Croager E.J., Mitchell C. et al.* Liver NKT cells: an account of heterogeneity // *Hepatology.*– 2003.– Vol. 38, N4.– P. 333–362.
24. *Morrison S.J., Hemmati H.D., Wandycz A.M., Weissman I.L.* The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1995.– Vol. 92, N22.– P. 10302–10306.
25. *Phillips R.L., Ernst R.E., Brunk B. et al.* The genetic program of hematopoietic stem cells // *Science.*– 2000.– Vol. 288, N5471.– P. 1635–1640.
26. *Prosper F., Stroncek D., McCarthy J. B. et al.* Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha 4 beta 1 integrin expression and function // *J. Clin. Invest.*– 1998.– Vol. 101, N11.– P. 2456–2467.
27. *Roy V., Miller J.S., Verfaillie C.M.* Phenotypic and functional characterization of committed and primitive myeloid and lymphoid hematopoietic precursors in human fetal liver // *Exp. Hematol.*– 1997.– Vol. 25, N5.– P. 387–394.
28. *Roy V., Verfaillie C.M.* Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: implication for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis // *Exp. Hematol.*– 1999.– Vol. 27, N2.– P. 302–312.
29. *Sasaki K., Sonoda Y.* Histometrical and three-dimensional analysis of liver hematopoiesis in the mouse embryo // *Arch. histol.* – 2000.–Vol. 63, N2.– P.137–146.
30. *Stopka T., Zivny J.H., Stopkova P. et al.* Human hematopoietic progenitors express erythropoietin // *Blood.*– 1998.– Vol. 91, N10.– P. 3766–3772.
31. *Surbek D.V., Steinman C., Burk M. et al.* Developmental changes in adhesion molecule expression in umbilical cord blood CD 34⁺ hematopoietic progenitor and stem cells // *Am. J. Obstet. Gynecol.*– 2000.– Vol. 183, N5.– P. 1152–1157.
32. *Suzuki A., Zheng Y., Kaneko S. et al.* Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver // *J. Cell Biol.*– 2002.– Vol. 156, N1.– P. 173–184.

36. *Verfaillie C.* Adhesion receptors as regulators of hematopoietic process // *Blood.*– 1998.– Vol. 92, N8.– P. 2609–2612.
37. *Wickenhauser C., Hillienhof A., Jungheim K. et al.* Detection and quantification of transforming growth factor beta (TGF-beta) and platelet-derived growth factor (PDGF) release by normal human megakaryocytes // *Leukemia.*– 1995.– Vol. 9, N2.– P. 310–315.
33. *Tavassoli M., Hardy C.L.* Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells // *Blood.* – 1990. – Vol. 76, N6.– P. 1059.
34. *Teixido J., Hemier M.E., Greenberg J.S., Ankelesaria P.* Role of β_1 and β_2 integrins in the adhesion of human CD 34^{hi} stem cells to bone marrow stroma // *J. Clin Invest.*–1992.– Vol. 90, N2.– P. 358–367.
35. *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.
36. *Verfaillie C.* Adhesion receptors as regulators of hematopoietic process // *Blood.*– 1998.– Vol. 92, N8.– P. 2609–2612.
37. *Wickenhauser C., Hillienhof A., Jungheim K. et al.* Detection and quantification of transforming growth factor beta (TGF-beta) and platelet-derived growth factor (PDGF) release by normal human megakaryocytes // *Leukemia.*– 1995.– Vol. 9, N2.– P. 310–315.

Поступила 03.03.2009
Рецензент А.Ю. Петренко

Accepted in 03.03.2009