

## Влияние гипотермического хранения до и после криоконсервирования на свойства ядерных компонентов и плазмы цельной кордовой крови человека

UDC 57.043:615.832.9:611.018.5.013.8

A.A. TSUTSAYEVA<sup>1\*</sup>, A.YA. TSYGANENKO<sup>2</sup>, I.A. ZHELTYAKOVA<sup>2</sup>,

E.V. BROVKO<sup>1</sup>, T.A. GLUSHKO<sup>1</sup>, E.D. ROZANOVA<sup>1</sup>

## Influence of Hypothermic Storage Before and After Cryopreservation on Properties of Nucleated Components and Whole Human Cord Blood Plasma

Представлены результаты исследований влияния продолжительности гипотермического хранения цельной кордовой крови человека (ККЧ) до и после криоконсервирования на морфофункциональные свойства, криоустойчивость ее ядерных компонентов и вируснейтрализующие свойства плазмы. Показано, что на этапах гипотермического хранения, в зависимости от его продолжительности, возникают нелетальные повреждения ядросодержащих клеток. Максимально допустимый срок гипотермического хранения ККЧ до ее криоконсервирования составляет 24 часа, после – не более 2-х часов. На этапах гипотермического хранения и после криоконсервирования достоверно не изменяется вируснейтрализующая активность плазмы ККЧ.

**Ключевые слова:** кордовая кровь человека, ядросодержащие клетки, плазма кордовой крови, вируснейтрализующее действие.

Представлено результати досліджень впливу гіпотермічного зберігання цілісної кордової крові людини (ККЛ) до та після криоконсервування на морфофункціональні властивості, криостійкість її ядерних компонентів та віруснейтралізуючі властивості плазми. Показано, що на етапах гіпотермічного зберігання, в залежності від його тривалості, виникають нелетальні пошкодження ядровмісних клітин. Максимально допустимий термін гіпотермічного зберігання ККЛ до її криоконсервування становить 24 години, після – не більше 2-х годин. На етапах гіпотермічного зберігання та після криоконсервування не змінюється віруснейтралізуюча активність плазми ККЛ.

**Ключові слова:** кордова кров людини, ядровмісні клітини, плазма кордової крові, віруснейтралізуюча дія.

There were presented research results of hypothermic storage duration influence of whole human cord blood before and after cryopreservation on morphofunctional parameters, cryostability of its nucleated components and virus-neutralizing plasma properties. There was shown that at hypothermic storage stage, depending on its duration, non-lethal damages of nucleated cells appeared. Maximal admissible term of hypothermic storage of human cord blood makes 24 hrs before cryopreservation and not more than 2 hrs after it. At hypothermic storage stages and after cryopreservation virus-neutralizing activity of human cord blood plasma does not statistically and significantly change.

**Key-words:** human cord blood, nucleated cells, cord blood plasma, virus-neutralising effect.

Кровь и ее компоненты применяют с лечебной и диагностической целью. Ядерные клетки крови используют для иммунного мониторинга на этапах терапии патологических состояний человека и определения HLA DR, DQ принадлежности. С диагностической целью в плазме выявляют уровень гормонов, ферментов, титр антител, циркулирующие иммунные комплексы, классы глобулинов, антигены возбудителей и другое.

При фракционировании крови получают лейкоцитарную, тромбоцитарную и эритроцитарную массу;

Blood and its components are applied with therapeutic and diagnostic purposes. Nucleated blood cells are used for immune monitoring at the stage of therapy of human pathological states and with the purpose of determining HLA DR, DQ reference. The level of hormones, enzymes, titer antibodies, circulating immune complexes, globulins, antigen pathogens, etc. were determined with diagnostic purpose in plasma.

During blood fractionation leukocyte, trombocyte and erythrocyte masses are obtained; albumin, fibrinogen, thrombin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -globulins, interferons etc. are isolated from plasma [3].

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

<sup>2</sup> Харьковский государственный медицинский университет

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

из плазмы выделяют альбумин, фибриноген, тромбин,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулины, интерфероны и др. [3].

В этой связи актуальной задачей является разработка эффективных способов долгосрочного хранения цельной крови, ее ядерных компонентов и плазмы без изменения их исходных свойств.

В литературе сведения о влиянии гипотермического хранения на криоустойчивость ядерных клеток в составе цельной крови противоречивы [2, 8], а данные о влиянии гипотермического хранения на свойства криоконсервированных ядерных компонентов крови отсутствуют.

Цель работы – изучение морфофункциональных свойств и криоустойчивости ядерных компонентов цельной кордовой крови человека (ККЧ) в зависимости от продолжительности гипотермического хранения до и после криоконсервирования.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили образцы ККЧ, полученные из материнского конца пуповины после отделения новорожденных, родившихся в срок у здоровых матерей. Кровь отбиралась в стерильные флаконы с добавлением антикоагулянта CPD (Украина) при помощи одноразовых систем забора крови.

Гипотермическое хранение кордовой крови осуществляли в стерильных стеклянных флаконах в бытовом холодильнике с температурным режимом 2-4°C.

Кровь замораживали в одноразовых пластиковых контейнерах (Украина) по двухэтапной, оптимальной для стволовых кроветворных клеток программе в замораживателе УОП-6 (Украина) без применения традиционных криопротекторов (растворы ДМСО, ПЭО) [9]. Криоконсервированные образцы хранились при температуре -196°C.

Образцы отогревали погружением контейнеров в водяную баню (40-41°C).

В зависимости от условий гипотермического хранения ККЧ была разделена на следующие группы:

ККЧ-1 – кровь, хранившаяся при 4°C в течение 24-х часов (использовали в качестве контроля);

ККЧ-2 – кровь, хранившаяся при 4°C в течение 48-х часов;

ККЧ-3 – кровь, криоконсервированная после 24-х часов предварительного гипотермического хранения;

ККЧ-4 – кровь, криоконсервированная после 48-ми часов предварительного гипотермического хранения;

ККЧ-5 – кровь, криоконсервированная после 24-х часов предварительного гипотермического

In this connection an actual task is development of reliable methods of long-term storage of the whole blood, its nucleated components and plasma with no changes in their initial properties.

There are contradictory data on the effect of hypothermic storage on cryoresistance of nucleated cells in the composition of whole blood and as no data concerning the influence of hypothermic storage on the properties of cryopreserved nucleated blood components [2, 8].

The research aim was to investigate morpho-functional properties and cryoresistance of nucleated components of the whole human cord blood (HCB) depending on the duration of hypothermic storage before and after cryopreservation.

### Materials and methods

Research objects were the samples of HCB, derived from mother's umbilical terminal after separating of term newborns from healthy mothers. Blood was procured into sterile bottles with adding CPD anticoagulant (Ukraine) using disposable blood sampling systems.

Hypothermic storage of cord blood was performed in sterile glass bottles in domestic refrigerator with temperature regimen of 2-4°C.

Blood was frozen in disposable plastic containers (Ukraine) according to two-stage optimal for hemopoietic stem cells program with UOP-6 freezer (Ukraine) with no use of traditional cryoprotectants (DMSO, PEO solutions) [5]. Cryopreserved samples were stored at -196°C.

Samples were thawed by plunging the containers into water bath (40-41°C).

Depending on hypothermic storage conditions HCB was divided into following groups:

HCB-1 is the blood stored at 4°C for 24 hrs (used as the control);

HCB-2 is the blood stored at 4°C for 48 hrs;

HCB-3 is the blood cryopreserved after 24 hrs' preliminary hypothermic storage;

HCB-4 is the blood cryopreserved after 48 hrs' preliminary hypothermic storage;

HCB-5 is the blood cryopreserved after 24hrs' preliminary hypothermic storage and stored after thawing under hypothermia conditions for 2 hrs;

HCB-6 is the blood cryopreserved after 24 hrs' preliminary hypothermic storage and stored after thawing under hypothermia conditions for 6 hrs;

HCB-7 is the blood cryopreserved after 24 hrs' preliminary hypothermic storage and stored after thawing under hypothermia conditions for 17 hrs;

HCB-8 is the blood cryopreserved after 24 hrs' preliminary hypothermic storage and stored after thawing under hypothermia conditions for 24 hrs.

хранения и хранившаяся после отогрева в условиях гипотермии 2 часа;

ККЧ-6 – кровь, криоконсервированная после 24-х часов предварительного гипотермического хранения и хранившаяся после отогрева в условиях гипотермии 6 часа;

ККЧ-7 – кровь, криоконсервированная после 24-х часов предварительного гипотермического хранения и хранившаяся после отогрева в условиях гипотермии 17 часов;

ККЧ-8 – кровь, криоконсервированная после 24-х часов предварительного гипотермического хранения и хранившаяся после отогрева в условиях гипотермии 24 часов.

В связи с объективными затруднениями в доставке крови непосредственно после ее забора в качестве контроля использовали образцы пуповинной крови, которые хранились в условиях гипотермии не более 24-х часов, так как ранее было установлено, что в течение этого времени не происходит достоверных изменений морфофункциональных свойств ядросодержащих клеток [9].

Количество ядросодержащих клеток определяли в камере Горяева [5], а сохранных – суправитальным окрашиванием суспензии клеток 3%-м раствором трипанового синего [1].

Клеточный спектр определяли в мазках крови, которые фиксировали в метаноле и окрашивали азур-эозином.

Популяции и субпопуляции лимфоцитов и кроветворных клеток крови определяли с помощью моноклональных антител [6]. Для этого ядросодержащие клетки до криоконсервирования выделяли в градиенте плотности фиколл-верографин, а после криоконсервирования осаждали путем центрифугирования.

Количество колониеобразующих единиц в культуре (КОЕк) подсчитывали по количеству колоний в агаровой культуре [7]. Характер колоний определяли на гистологических препаратах после окрашивания гематоксилин-эозином.

Ядросодержащие клетки для определения их фагоцитарной активности в некриоконсервированных образцах выделяли с помощью 3%-го раствора желатина [4]. После криоконсервирования ядросодержащие клетки осаждали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 40 мин.

Фагоцитарную активность моноцитарно-макрофагальных и недифференцированных клеток изучали по общепринятой методике [5]. Окислительно-восстановительный потенциал клеток определяли при помощи НСТ-теста [3]. Активность метаболического процесса, обеспечивающего внутриклеточную выработку  $H_2O_2$  (одной из главных бактерицидных субстанций), устанавливали по количеству гранул внутриклеточного

Because of difficulties with blood delivery directly after its procurement as the control there were used the samples of umbilical blood which were stored under hypothermic conditions not more than 24 hrs, since it was previously found that within this time there were no statistically significant changes in morpho-functional properties of nucleated cells [9].

The number of nucleated cells was investigated in Goryaev's chamber [5] and the one for survived was done with supravital staining of cells with 3% tripane blue solution [1].

Cell spectrum was studied in blood smears which were fixed in methanol and stained with azur-eosin.

Populations and subpopulations of lymphocytes were found using monoclonal antibodies [6]. With this aim nucleated cells before cryopreservation were isolated in ficoll-verografin density gradient and after it they were precipitated by centrifugation.

The number of colony-forming units in culture (CFUc) was examined by calculating the amount of colonies in agar culture [7]. Character of colonies was found after staining with hematoxylin-eosin.

Nucleated cells for determining of their phagocyte activity in non-cryopreserved samples were isolated with 3% gelatin solution [4]. After cryopreservation nucleated cells were precipitated by centrifugation at 1,500 rot/min for 40 min.

Phagocyte activity of monocyte-macrophage and non-differentiated cells were investigated according to traditional methods [5]. Redox cell potential was studied using NBT-test [3]. Activity of metabolic process providing intracellular production of  $H_2O_2$  (one of the main bactericide substances) was found on the number of granules of intracellular diformazan, and lisosomal enzymes were done on the cell quantity and staining intensity, positively responding to non-specific esterase and acid phosphatase [3].

Virus-neutralizing titer in plasma was examined using hem agglutination inhibition reaction. In tray wells two-fold consequent dilutions of plasma were prepared, afterwards they were mixed with equal virus volume. The mixture was shaken and incubated at 37°C for 40 min then it was added with 1% erythrocyte suspension. The reaction was recorded in 30–45 min of incubation in thermostat at 37°C [5]. In reaction there has been used A/Victoria grippe virus with hem agglutinating titer 1:16.

HCB plasma proteins before and after cryopreservation were divided with the method of gel chromatography on the column with sephadex G-200 (column height is 22 cm, diameter is 2 cm). One milliliter of a sample was placed on column. The fractions were removed by 3 ml. Protein concentration was spectrophotometrically examined [13].

Obtained results were processed on Student-Fisher's method. Statistical significance of calculations is 95%.

диформаза, лизосомальных ферментов – по количеству и интенсивности окраски клеток, положительно реагирующих на неспецифическую эстеразу и кислую фосфатазу [3].

Вируснейтрализующий титр в плазме определяли при помощи реакции торможения гемагглютинации. В лунках планшета готовили двукратные последовательные разведения плазмы и смешивали с равным объемом вируса. Смесь встряхивали и инкубировали при температуре 37°C в течение 40 мин, после этого добавляли 1%-ю взвесь эритроцитов. Реакцию учитывали через 30-45 мин инкубации в термостате при 37°C [5]. В реакции использовался вирус гриппа А/Виктория с гемагглютинирующим титром 1:16.

Белки плазмы ККЧ до и после криоконсервирования разделяли методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200 (высота колонки 22 см, диаметр 2 см). На колонку наносили 1 мл образца. Фракции снимали по 3 мл. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом [12].

Полученные результаты обрабатывали по методу Стьюдента-Фишера. Достоверность расчетов – 95%.

### Результаты и обсуждение

Установлено, что в образцах крови, хранившихся в условиях гипотермии в течение 48 ч (ККЧ-2), количество ядросодержащих и сохранных клеток достоверно не изменялось по сравнению с нативными образцами (табл. 1).

Клеточный состав крови в образцах ККЧ-1 и ККЧ-2 также достоверно не изменялся (рис. 1).

После криоконсервирования крови, предварительно хранившейся в течение 24-х часов при температуре 4°C (ККЧ-3), количество ядросодержащих и сохранных клеток не изменялось по сравнению с некриоконсервированными образцами (табл. 1). При этом снижалось количество нейтрофилов, увеличивалось количество недифференцированных клеток, определялись фибробластоподобные клетки. Количество лимфоцитов и моноцитов достоверно не изменялось (рис. 2).

После криоконсервирования крови, предварительно хранившейся в условиях гипотермии в течение 48 ч (ККЧ-4), достоверно снижалось количество ядросодержащих и сохранных клеток (табл. 1), количество лимфоцитов и нейтрофилов (рис. 3) по сравнению с ККЧ-1 и ККЧ-2.

Было установлено, что через 2 ч гипотермического хранения в деконсервированной крови (ККЧ-5) уменьшалось относительное количество нейтрофилов по сравнению с ККЧ-1 (рис. 4). Количество ядросодержащих, сохранных клеток,

**Таблица 1.** Количество ядросодержащих и сохранных клеток кордовой крови в зависимости от сроков гипотермического хранения и последующего криоконсервирования

**Table 1.** Number of survived and nucleated cell in cord blood after hypothermic storage and following cryopreservation

Группы Groups	Количество клеток Cell content	
	ядросодержащих, ×10 <sup>7</sup> /мл nucleated, ×10 <sup>7</sup> per ml	сохранных, % survived, %
ККЧ-1 НСВ-1	1,15±0,031	97,00± 1,02
ККЧ-2 НСВ-2	1,1±0,87	96,00±1,02
ККЧ-3 НСВ-3	1,15±0,033	83,00±1,23
ККЧ-4 НСВ-4	0,88±0,66	37,00±1,41*

**Примечание:** \* – различия достоверны по сравнению с ККЧ-1 и ККЧ-2 (p<0,05).

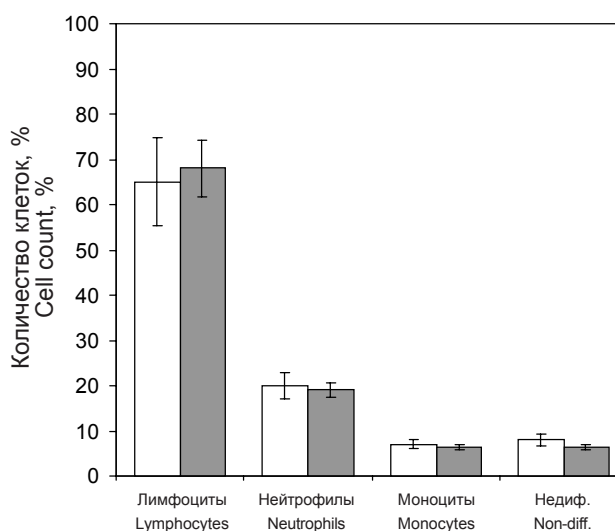
**Note:** \* – statistically significant difference comparing to HCB-1 and HCB-2 data (p<0.05).

### Results and discussion

There was established that in blood samples, stored under hypothermic conditions during 48 hrs (HCB-2) the quantity of nucleated and survived cells were not statistically and significantly changed in comparison with native samples (Table 1).

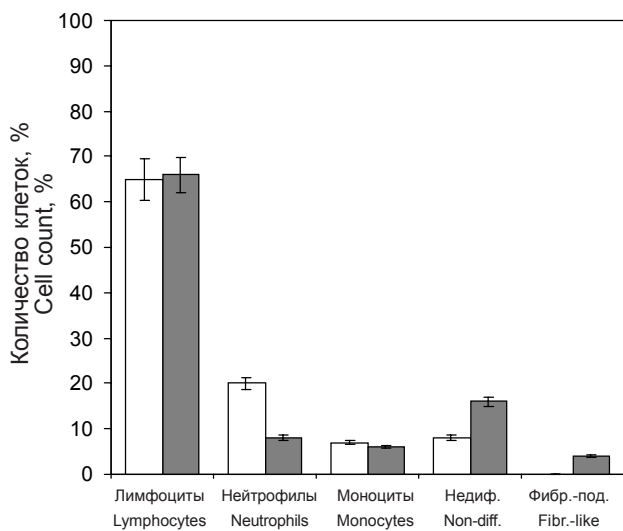
Cell blood structure in HCB-1 samples and HCB-2 also were not statistically and significantly altered (Fig. 1).

After cryopreservation of blood pre-stored during 24 hrs at 4°C (HCB-3), number of nucleated and



**Рис. 1.** Цитограмма ККЧ в зависимости от сроков гипотермического хранения до криоконсервирования: □ – ККЧ-1; ■ – ККЧ-2; недиф. – недифференцированные клетки.

**Fig. 1.** HCB cytogram depending on terms of hypothermic storage before cryopreservation: □ – HCB-1; ■ – HCB-2; Non-diff. – non-differentiated cells.

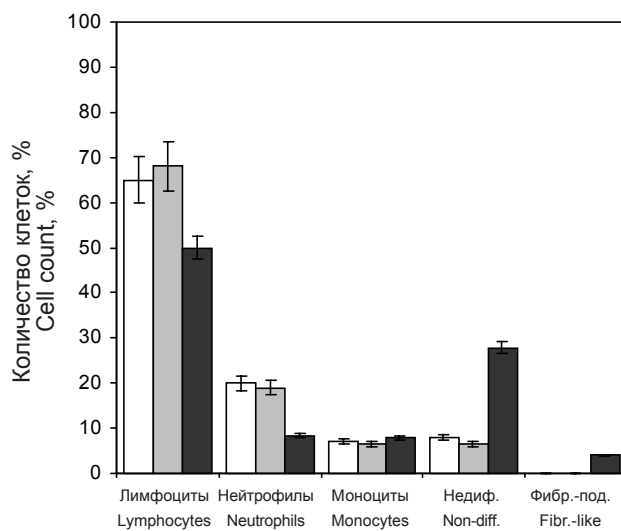


**Рис. 2.** Цитограмма ККЧ после гипотермического хранения и криоконсервирования: □ — ККЧ-1; ■ — ККЧ-3; недиф. — недифференцированные клетки; фибр.-под. — фибробластоподобные клетки; \* — изменения достоверны по сравнению с ККЧ-1 ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2.** HCB cytogram after hypothermic storage and cryopreservation: □ — HCB-1; ■ — HCB-3; Non-diff. — non-differentiated cells; Fibr.-like — fibroblast-like cells; \* — statistically significant changes, comparing to HCB-1 data ( $p < 0.05$ ).

лимфоцитов, моноцитов не изменялось. Через 6 ч гипотермического хранения (ККЧ-6) достоверно снижалось количество ядерных клеток и относительное количество нейтрофилов, а количество сохранных клеток не изменялось. Через 17 ч хранения при температуре 4°C (ККЧ-7) уменьшалось количество ядросодержащих клеток и относительное количество нейтрофилов, достоверно возрастало количество фибробластоподобных клеток, отмечалась тенденция к снижению количества лимфоцитов; количество сохранных клеток не изменялось. Через 24 ч гипотермического хранения (ККЧ-8) достоверно снижалось количество ядросодержащих клеток, лимфоцитов, нейтрофилов и возрастал процент фибробластоподобных клеток (рис. 4).

Проведенный анализ спектра ядерных клеток ККЧ после гипотермического хранения и последующего криоконсервирования показал, что в течение 24 и 48 часов гипотермического хранения достоверно не изменялся популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов, предшественников Т-лимфоцитов, стволовых кроветворных и некроветворных клеток, моноцитов. При криоконсервировании ККЧ после 24-х часов гипотермического хранения достоверных изменений в клеточном спектре выявлено не было. При криоконсервировании крови через 48 ч предварительного хранения при температуре 4°C достоверно увеличивалось количество Т-хелперов (табл. 2).



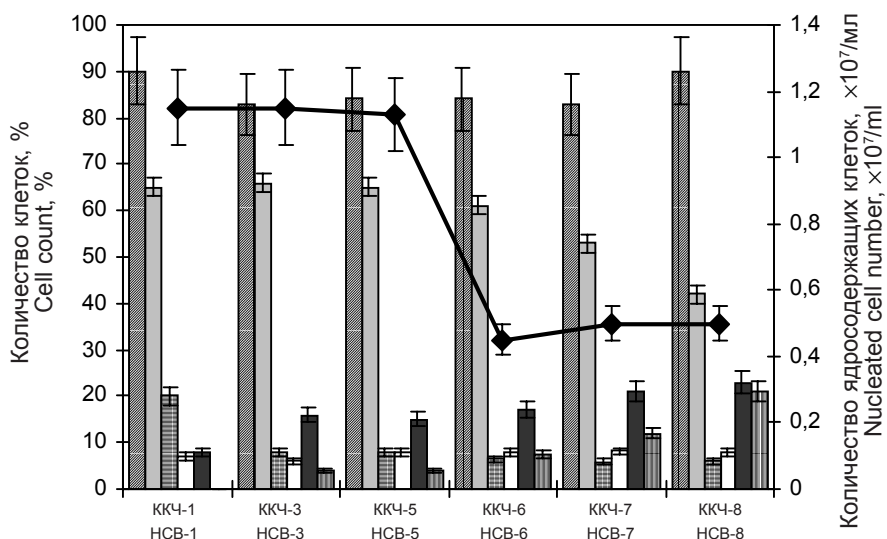
**Рис. 3.** Цитограмма ККЧ после гипотермического хранения и криоконсервирования: □ — ККЧ-1; □ — ККЧ-3; ■ — ККЧ-4; недиф. — недифференцированные клетки; фибр.-под. — фибробластоподобные клетки; \* — изменения достоверны по сравнению с ККЧ-1 и ККЧ-2 ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 3.** HCB cytogram after hypothermic storage and cryopreservation: □ — HCB-1; □ — HCB-2; ■ — HCB-4; Non-diff. — non-differentiated cells; Fibr.-like — fibroblast-like cells; \* — statistically significant changes, comparing to HCB-1 and HCB-2 data ( $p < 0.05$ ).

survived cells did not change if compared with non-cryopreserved samples (Table 1). In this case the amount of neutrophils decreased, the number of non-differentiated cells increased, there were found fibroblast-like cells. The number of lymphocytes and monocytes were not statistically and significantly varied (Fig. 2).

After cryopreservation of blood, preliminarily stored under hypothermia conditions for 48 hrs (HCB-4), the number of nucleated and survived cells statistically and significantly reduced (Table 1), as well as the amount of lymphocytes and neutrophils (Fig. 3) in comparison with HCB-1 and HCB-2.

It has been found that in 2hrs of hypothermic storage in frozen-thawed blood (HCB-5) relative number of neutrophils reduced in comparison with HCB-1 (Fig. 4). The number of nucleated, survived cells, lymphocytes, monocytes did not change. In 6 hrs of hypothermic storage (HCB-6) the number of nucleated cells and relative one for neutrophils decreased, and that for survived did not change. In 17 hrs of storage at 4°C (HCB-7) the amount of nucleated cells reduced as well as relative number of neutrophils, the amount of fibroblast-like cells statistically and significantly enhanced, there was found a tendency to the reduction of lymphocyte number; the number of survived cells did not alter. In 24 hrs of hypothermic storage of frozen-thawed cord blood (HCB-8) the amount of nucleated cells, lymphocytes, neutrophils statistically and significantly decreased, and the percent of fibroblast-like cells increased (Fig. 4).



**Рис. 4.** Изменение клеточного состава криоконсервированной ККЧ в зависимости от сроков гипотермического хранения: ▨ – сохранные клетки; □ – лимфоциты; ▤ – нейтрофилы; ▥ – моноциты; ■ – недифференцированные клетки; ■ – фибробластоподобные клетки; ◆ – ядросодержащие клетки; \* – изменения достоверны по сравнению с ККЧ-1 ( $p < 0,05$ ); # – различия достоверны по сравнению с ККЧ-3 ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 4.** Changes in HCB cell composition depending on terms of hypothermic storage: ▨ – survived cells; □ – lymphocytes; ▤ – neutrophils; ▥ – monocytes; ■ – non-differentiated cells; ■ – fibroblast-like cells; ◆ – nucleated cells; \* – statistically significant changes comparing to HCB-1 ( $p < 0.05$ ); # – statistically significant changes comparing to HCB-3 ( $p < 0.05$ ).

До криоконсервирования люминесцентная метка определялась в виде светящихся гранул, равномерно расположенных по всей мембране клеток. После криоконсервирования у части клеток люминесцентные гранулы концентрировались на одном из полюсов по типу “cap formation”.

Через 24 ч гипотермического хранения кордовой крови количество фагоцитирующих клеток составляло  $86 \pm 1,77\%$ , из них  $75 \pm 1,07\%$  – клетки в стадии поглощения и  $11 \pm 0,02\%$  – в стадии аттракции. Количество микробов, поглощенных одной клеткой, составляло  $8,5 \pm 0,03$ . Через 48 часов гипотермического хранения процент фагоцитирующих клеток, количество микробов, поглощенных одной клеткой и количество клеток в стадиях аттракции и поглощения достоверно не изменялись (рис. 5).

В образцах крови, криоконсервированных после предварительного гипотермического хранения в течение 24 и 48 ч (ККЧ-3 и ККЧ-4 соответственно), достоверно снижалось количество фагоцитирующих клеток. При этом возрастал процент клеток в стадии аттракции, снижалось количество клеток в стадии поглощения и количество микробов, поглощенных одной клеткой (рис. 6).

При последующем гипотермическом хранении деконсервированных образцов в течение 24-х часов фагоцитарная активность ядросодержащих клеток достоверно не изменялась по сравнению с ККЧ-3.

Performed analysis of nucleated cell spectra after hypothermic storage and following cryopreservation has shown that during 24 and 48 hrs of this storage the population and subpopulation compositions of lymphocytes, T-lymphocytes precursors, hemopoietic and non-hemopoietic stem cells, monocytes did not statistically and significantly changed. During cryopreservation of HCB after 24 hrs of hypothermic storage there were found no statistical and significant changes in cell spectrum. When cryopreserving the blood in 48 hrs of preliminary storage at  $4^\circ\text{C}$  statistically and significantly increased the number of T-helpers (Table 2).

Before cryopreservation luminescent label was found as luminous granules evenly located along the whole cell membrane. After cryopreservation in part of cells luminescent granules

were concentrated on one of the poles of “cap formation” type.

In 24 hrs of hypothermic storage of cord blood the number of phagocytosing cells made  $86 \pm 1.77\%$ ,  $75 \pm 1.07\%$  of them were the cells at absorption stage and  $11 \pm 0.02\%$  at attraction stage. Number of microbes

**Таблица 2.** Влияние гипотермического хранения и последующего криоконсервирования на процентное соотношение популяций и субпопуляций ядросодержащих клеток ККЧ

**Table 2.** Effect of hypothermic storage and following freeze-thawing on populations and subpopulations ratio (%) in HCB nucleated cells

Рецепторы Receptors	ККЧ-1 НСВ-1	ККЧ-2 НСВ-2	ККЧ-3 НСВ-3	ККЧ-4 НСВ-4
CD3	$16,60 \pm 0,54$	$16,20 \pm 0,29$	$16,33 \pm 0,58$	$15,97 \pm 0,76$
CD4	$17,75 \pm 0,98$	$16,67 \pm 0,56$	$20 \pm 0,89$	$30,60 \pm 1,03^*$
CD8	$25,20 \pm 0,87$	$23,80 \pm 1,03$	$23,0 \pm 0,9$	$13,46 \pm 0,64$
CD14	$7,33 \pm 0,01$	$8,10 \pm 0,34$	$7,12 \pm 0,06$	$7,90 \pm 0,23$
CD19	$10,00 \pm 0,34$	$10,3 \pm 1,2$	$11,5 \pm 0,12$	$9,60 \pm 1,01$
CD34	$5,10 \pm 0,86$	$4,40 \pm 0,67$	$4,70 \pm 0,67$	$4,30 \pm 0,35$
CD56	$19,8 \pm 0,97$	$18,30 \pm 0,76$	$19,50 \pm 0,01$	$17,90 \pm 0,54$

**Примечание:** \* – различия достоверны по сравнению с ККЧ-1 и ККЧ-2 ( $p < 0,05$ ).

**Note:** \* – statistically significant differences comparing to HCB-1 and HCB-2 data ( $p < 0.05$ ).

В клеточном спектре наибольшей фагоцитарной активностью обладали нейтрофилы и моноциты, слабой – недифференцированные клетки (рис. 7).

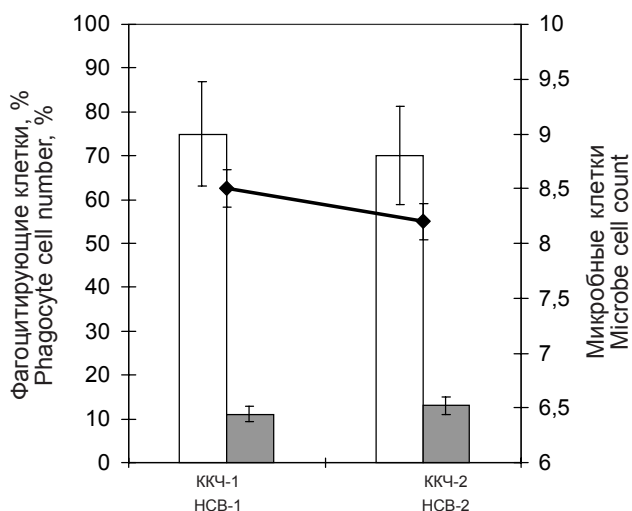
Количество НСТ-положительных клеток достоверно не изменялось в течение 48 ч гипотермического хранения ККЧ (рис. 8).

В образцах ККЧ-3, ККЧ-4, ККЧ-5, ККЧ-6 и ККЧ-7 достоверно не изменялось количество НСТ-положительных клеток и клеток, положительно реагирующих на кислую фосфатазу и неспецифическую эстеразу. Через 24 ч гипотермического хранения деконсервированных образцов (ККЧ-8) наблюдалось снижение количества НСТ-положительных клеток (рис. 8).

Как видно из табл. 3, количество КОЕк в ККЧ, хранившейся 24 и 48 ч при температуре 4°C, в агаровых культурах достоверно не изменялось, тогда как в криоконсервированной кордовой крови количество КОЕк достоверно снижалось после 17 и 24 часов ее хранения при 4°C (ККЧ-7, ККЧ-8).

В агаровой культуре определялись миелоидно-моноцитарные, эритроидные колонии, колонии недифференцированных клеток, а также колонии фибробластов, образующие волокнистые структуры.

Методом гель-хроматографии из плазмы кордовой крови было выделено 22 белковые фракции. Показано, что криоконсервирование плазмы ККЧ по программе стволовых кроветворных клеток [9] через 24 и 48 ч гипотермического хранения не оказывает достоверного влияния на молекулярную массу белков плазмы (табл. 4).



**Рис. 5.** Фагоцитарная активность ядерных клеток ККЧ в зависимости от сроков гипотермического хранения до криоконсервирования: □ – стадия поглощения; ■ – стадия аттракции; ◆ – количество микробов в клетке.

**Fig. 5.** Phagocyte activity of HCB nucleated cells depending on terms of hypothermic storage before cryopreservation: □ – absorption stage; ■ – attraction stage; ◆ – microbe number in cell.

**Таблица 3.** Влияние гипотермического хранения до и после криоконсервирования на содержание КОЕк в суспензии ядерных клеток ККЧ

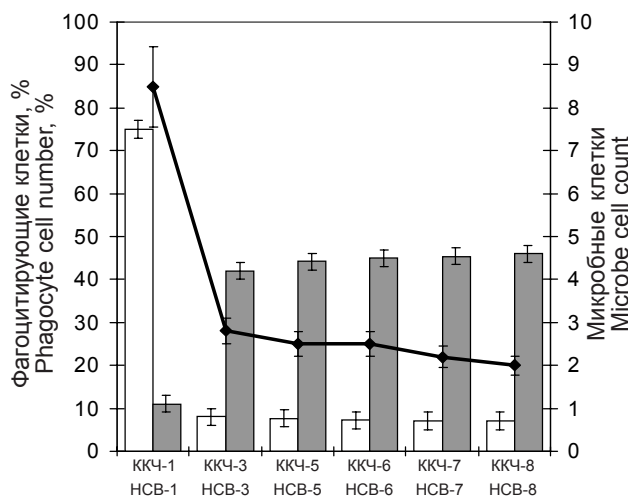
**Table 3.** Effect of hypothermic storage before and after cryopreservation on CFUc content in HCB nucleated cell suspension

Группа Group	Количество КОЕк,% CFUc number,%
ККЧ-1 HCB-1	2,95±0,95
ККЧ-2 HCB-2	3,0±0,7
ККЧ-3 HCB-3	3,2±0,3
ККЧ-4 HCB-4	3,0±0,7
ККЧ-5 HCB-5	3,0±0,75
ККЧ-6 HCB-6	2,8±0,2
ККЧ-7 HCB-7	0,9±0,1*
ККЧ-8 HCB-8	0,1±0,025*

**Примечание:** \* – различия достоверны по сравнению с ККЧ-1 и ККЧ-2 ( $p<0,05$ ).

**Note:** \* – statistically significant differences comparing to HCB-1 and HCB-2 data ( $p<0.05$ ).

absorbed by a cell was  $8.5\pm0.03\%$ . In 48 hrs of hypothermic storage the percent of phagocytosing cells, number of absorbed microbes and amount of cells at stages of attraction and absorption do not statistically and significantly change (Fig. 5).



**Рис. 6.** Фагоцитарная активность ядерных клеток ККЧ в зависимости от сроков гипотермического хранения до и после криоконсервирования: □ – стадия поглощения; ■ – стадия аттракции; ◆ – количество микробов в клетке; \* – изменения достоверны по сравнению с ККЧ-1 ( $p<0,05$ ).

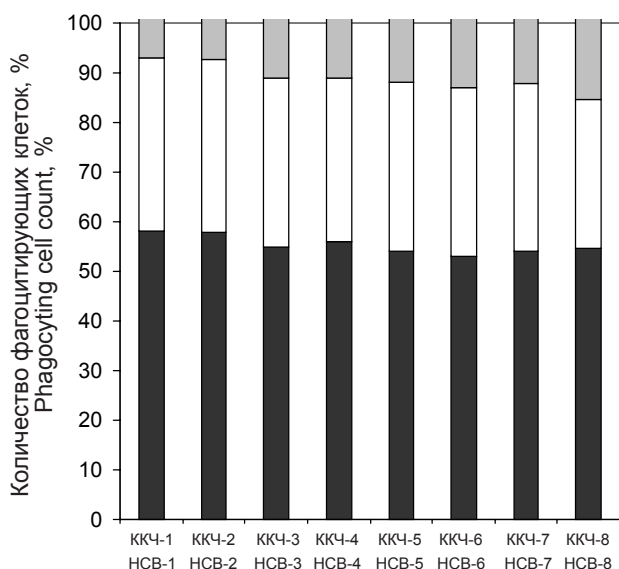
**Fig. 6.** Phagocyte activity of HCB nucleated cells depending on terms of hypothermic storage before and after cryopreservation: □ – absorption stage; ■ – attraction stage; ◆ – microbe number in a cell; \* – statistically significant changes comparing to HCB-1 data ( $p<0.05$ ).

Установлено, что вирус-нейтрализующий титр плазмы не изменялся на протяжении 48 ч гипотермического хранения, а также после криоконсервирования и в течение 24-х часов после отогрева. Изменение противовирусного титра отмечалось через 48 часов хранения криоконсервированных образцов плазмы ККЧ (рис. 9).

### Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на этапах гипотермического хранения в зависимости от его продолжительности возникают нелетальные повреждения ядродержащих клеток. Так, через 48 ч хранения снижается криоустойчивость клеток при сохранении их морфофункциональных свойств.

Максимально допустимый срок гипотермического хранения кордовой крови человека до ее криоконсервирования – 24 ч, когда достоверно не изменяются клеточный состав, криоустойчивость и морфофункциональные свойства ядродержащих компонентов крови,



**Рис. 7.** Клеточный состав фагоцитов кордовой крови человека в зависимости от сроков гипотермического хранения до и после криоконсервирования: ■ – нейтрофилы; □ – моноциты; ▒ – недифференцированные клетки.

**Fig. 7.** Cell spectra of HCB phagocytes depending on terms of hypothermic storage before and after cryopreservation: ■ – neutrophils; □ – monocytes; ▒ – non-differentiated cells.

**Таблица 4.** Молекулярная масса белковых фракций плазмы ККЧ до и после криоконсервирования

**Table 4.** Molecular weight of HCB plasma protein fractions before and after cryopreservation

Номер фракции Fraction's Nr	Молекулярная масса,кД Molecular weight,kDa		Номер фракции Fraction's Nr	Молекулярная масса,кД Molecular weight,kDa	
	до криоконсер- вирования before cryo – preservation	после криоконсер- вирования after cryo – preservation		до криоконсер- вирования before cryo – preservation	после криоконсер- вирования after cryo – preservation
3	–	–	13	44	44
4	800	800	14	32	32
5	562	562	15	24	24
6	407	407	16	17	17
7	295	295	17	13	13
8	219	209	18	9	9
9	155	155	19	7	7
10	117	115	20	5	5
11	83	83	21	<5	<5
12	62	62	22	<5	<5

In blood samples cryopreserved after preliminary hypothermic storage for 24 and 48 hrs (HCB-3 and HCB-4, correspondingly) the number of phagocytizing cells significantly and statistically reduced. In this case the percent of cells at attraction stage increased, amount of cells at absorption stage and quantity of microbes absorbed by a cell decreased (Fig. 6).

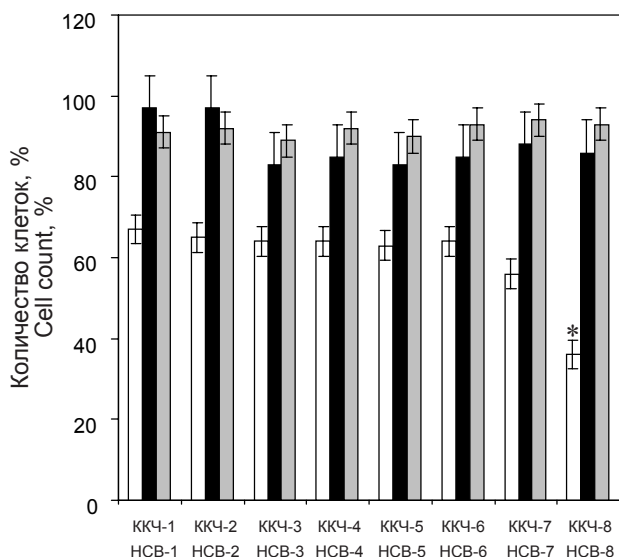
During following hypothermic storage of frozen-thawed for 14 hrs phagocyte activity of nucleated cells was not statistically and significantly altered if compared with HCB-3. In cell spectrum the highest phagocyte activity was noted for neutrophils and monocytes, lower one was found in non-differentiated cells (Fig. 7).

Number of HCB-positive cells did not statistically and significantly change for 48 hrs of HCB hypothermic storage (Fig. 8).

In HCB-3, HCB-4, HCB-5, HCB-6 and HCB-7 samples the number of NBT-positive cells and those positively responding to acid phosphatase and non-specific esterase. In 24 hrs of hypothermic storage of frozen-thawed samples (HCB-8) there was observed a statistically and significantly reduction in the number of HCB-positive cells (Fig. 8).

Table 3 demonstrates the number of CFUc in HCB, stored for 24 and 48 hrs at 4°C, did not statistically and significantly change in agar cultures, meanwhile in cryopreserved cord blood the number of CFUc statistically and significantly reduced after 17 and 24 hrs of its storage at 4°C (HCB-7, HCB-8).





**Рис. 8.** Динамика изменения гистохимических показателей фагоцитов ККЧ в зависимости от сроков гипотермического хранения до и после криоконсервирования: □ – НСТ-положительные клетки; ■ – кислая фосфатаза; ▒ – неспецифическая эстераза; \* – изменения достоверны по сравнению с ККЧ-1 и ККЧ-3 ( $p < 0,05$ ).

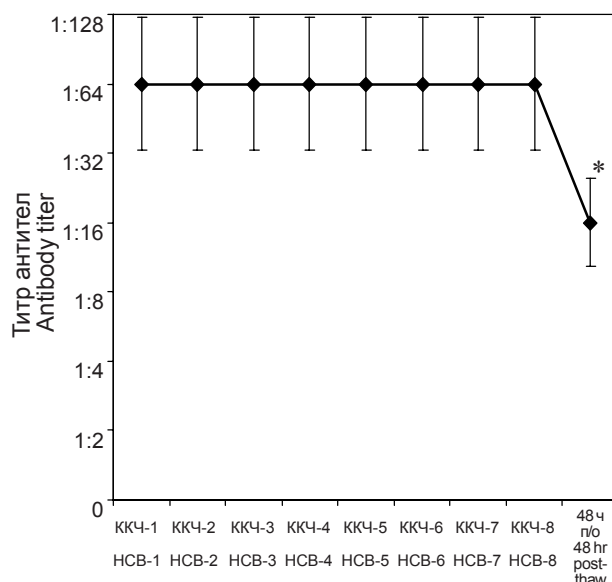
**Fig. 8.** Changes in histochemical indices of HCB phagocytes depending on terms of hypothermic storage before and after cryopreservation: □ – NBT-positive cells; ■ – acid phosphatase; ▒ – non-specific esterase; \* – statistically significant changes, comparing to HCB-1 and HCB-3 data ( $p < 0.05$ ).

белковый спектр и вируснейтрализующий титр плазмы. В крови, криоконсервированной спустя 24 часа гипотермического хранения достоверно не изменялось количество, пролиферативная активность и направленность дифференцировки кроветворных клеток.

При воздействии гипотермии и последующего криоконсервирования происходит латеральная сепарация маркерных антигенов лимфоцитов, чем объясняется формирование люминесцентной метки по типу “cap-formation”.

Программа замораживания, ранее разработанная для стволовых кроветворных клеток костного мозга, оказалась оптимальной и для моноцитов, предшественников фибробластов и дендритных клеток кордовой крови.

Количество фагоцитирующих клеток в крови, криоконсервированной после 24-х часов предварительного хранения в условиях гипотермии, достоверно снижалось, что можно объяснить уменьшением количества нейтрофилов, которые являются наиболее активно фагоцитирующими клетками. Среди фагоцитов приблизительно в 4 раза возрастало количество клеток в стадии аттракции и в 9 раз снижалось количество клеток в стадии поглощения, что подтверждает ранее установленный факт нарушения физико-химических



**Рис. 9.** Влияние гипотермического хранения до и после криоконсервирования на противовирусный титр плазмы ККЧ: 48 ч п/р – 48 часов после отогрева; \* – различия достоверны по сравнению с ККЧ-1 и ККЧ-3 ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 9.** Effect of hypothermic storage before and after cryopreservation on HCB plasma antivirus titer: \* – statistically significant changes, comparing to HCB-1 and HCB-3 data ( $p < 0.05$ ).

In agar culture there were found myeloid-monocyte, erythroid colonies, those for non-differentiated cells, as well as colonies of fibroblasts, forming fibrous structures.

By gel chromatography there were isolated 22 protein fractions from cord blood. HCB cryopreservation according to the program of hemopoietic stem cells [9] has been shown as not affecting statistically and significantly molecular weight of protein plasma 24 and 48 hrs after hypothermic storage (Table 4).

Plasma virus-neutralizing titer was found unchanged within 48 hrs of hypothermic storage as well as after cryopreservation and during 24 hrs after thawing. Alteration of antivirus titer was noted in 48 hrs of storage for cryopreserved samples of HCB plasma (Fig. 9).

## Conclusions

Obtained results testify to the fact that at the stage of hypothermic storage depending on its duration non-lethal damages of nucleated cells appear. Thus, in 48 hrs of storage cell cryoresistance reduces with preserving their morphological properties.

Maximal admissible term of hypothermic storage for HCB before its cryopreservation is 24 hrs, when cell composition, cryoresistance and morphofunctional properties of blood nucleated components and also protein spectrum and plasma virus-neutralizing titer are not statistically and significantly changed. In blood,

свойств, а также изменения топографии распределения белковых, липидных и белково-липидных комплексов в мембране клеток [11].

Таким образом, максимально допустимый срок гипотермического хранения кордовой крови человека до и после криоконсервирования, когда ее ядерные компоненты можно использовать для иммунного мониторинга, а плазму для определения титра противовирусных антител, не более 24-х часов до и 2-х часов после криоконсервирования.

## Литература

1. *Иммунология: Практикум* / Е.У. Пастер, И.И. Овод, Н.Е. Вихоть и др. – Киев: Вища школа, 1989. – 304 с.
2. *Лаврик С.С., Когут Г.И.* Кровь, холод и жизнь. – Киев: Наук. думка, 1984. – 72 с.
3. *Лойд З., Россау Р., Шиллер Г.* Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. – М.: Мир, 1982. – 289 с.
4. *Прикладная иммунология* / Под ред. А.А. Сохина, Е.Ф. Чернушенко. – К.: Здоров'я, 1984. – 320 с.
5. *Руководство по клиническим лабораторным исследованиям* // Под редакцией Л.Г. Смирновой, Е.А. Кост. – М.: Медицина, 1960. – 383 с.
6. *Филатов А.В., Багурич П.С., Маркова Н.А. и др.* Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов человека с помощью панели моноклональных антител // Гистология и трансфузиология. – 1990. – №1. – С. 16-19.
7. *Чертков И.Л., Гуревич О.А.* Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. – М.: Медицина, 1984. – С. 210-212.
8. *Юрасов С.В., Владимирская Е.Б., Румянцев А.Г. и др.* Выделение гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови человека для трансплантации // Гематология и трансфузиология. – 1997. – Т. 42, №2. – С. 10-15.
9. *Пат. України №31847А МПК<sup>6</sup> А01N1/02.* Спосіб криоконсервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаєва, В.І. Грищенко, О.В. Кудокотцева та ін. Заявл. 05.11.98. Опубл. 15.12.2000. – Бюл. №7. – С. 1.10.
10. *Abdel-Mageed A., Rosalio M.L.U., Hutcheson C.E.* Effect of temperature variation on cell number, viability and clonogenic potential // *Blood*. – 1997. – Vol.90, N10. – P. 321b (4194).
11. *Bryan D.K., Fuller T.C., Huggins C.E.* Subpopulation recovery functional recovery, kinetics of concanavalin A and topographical analysis of cryopreserved human peripheral lymphocytes // *Blood*. – 1993. – Vol. 81, N7. – P. 655-656.
12. *Harris D.A.* Spectrophotometric assays / In: *Spectrophotometry and spectrofluorimetry*. – Washington: IRL Press, 1987. – P. 49-90.

Поступила 13.09.2005

cryopreserved after 24 hrs of hypothermic storage there were no statistical and significant changes in number, proliferative activity and hemopoietic cells' differentiation direction.

Under hypothermic effect and following cryopreservation there is lateral separation of marker antigens of lymphocytes, that explains the formation of luminescent label of "cap-formation" type.

Freezing program previously developed for hemopoietic stem cells occurred to be optimal for monocytes as well, precursors of fibroblasts and dendritic cells of cord blood.

The number of fagocytosing cells in blood, cryopreserved 24 hrs later pre-storage under hypothermic conditions, statistically and significantly decreased, that could be explained by reduction of the amount of neutrophils, being the most actively phagocytosing cells. Among phagocytes the number of cells at attraction stage increased nearly four times, and the one at absorption stage reduced nine times, that confirmed previously established fact of disorder in physical and chemical properties as well as changes in topography of protein distribution, lipid and protein-lipid complexes in cell membrane [11].

Thus maximally admissible terms of human cord blood hypothermic storage before and after cryopreservation when its nucleated components could be used for immune monitoring, and plasma for determining the titer of antiviral antibodies, are not more than 24 hrs before and 2 hrs after cryopreservation.

## References

1. *Immunology: Practicum* / E.U. Paster, I.I. Ovod, N.E. Vykhot et al. – Kiev: Vyscha shkola, 1989. – 304 p.
2. *Lavrik S.S., Kogut G.I.* Blood, cold and life. – Kiev: Naukova dumka, 1984. – 72 p.
3. *Loyd Z., Rossau R., Shiller G.* Histochemistry of enzymes. Laboratory methods. – Moscow: Mir, 1982. – 289 p.
4. *Applied immunology* / Ed. by A.A. Sokhina, E.F. Chernushenko. – Kiev: Zdorovya, 1984. – 320 p.
5. *Manual on clinical laboratory researches* // Ed. by L.G. Smirnova, E.A. Kost. – Moscow: Meditsina, 1960. – 383 p.
6. *Filatova A.V., Bagurin P.S., Markova N.A. et al.* Study of human lymphocyte subpopulation composition with the help of monoclonal antibodies set // *Histology and transfusiology*. – 1990. – N1. – P. 16-19.
7. *Chertkov I.L., Gurevich O.A.* Hematopoietic stem cell and its micro-environment. – Moscow: Meditsina, 1984. – P. 210-212.
8. *Yurasov S.V., Vladimirskaia E.B., Rumyantsev A.G. et al.* Isolation of hematopoietic stem cells from human cord blood for transplantation // *Gematologiya i Transfuziologiya*. – 1997. – Vol. 42, N2. – P.10-15.
9. *Ukraine Patent N31847A IPC 6 A01N1/02.* Method of cryopreservation of cord blood hematopoietic cells / A.O. Tsutsayeva, V.I. Grischenko, O.V. Kudokotseva et al. Declared 05.11.98. Publ. 15.12.2000. Bull. N7. – II. – P. 1-10.
10. *Abdel-Mageed A., Rosalio M.L.U., Hutcheson C.E.* Effect of temperature variation on cell number, viability and clonogenic potential // *Blood*. – 1997. – Vol.90, N10. – P. 321b (4194).

11. *Bryan D.K., Fuller T.C., Huggins C.E.* Subpopulation recovery functional recovery, kinetics of concanavalin A and topographical analysis of cryopreserved human peripheral lymphocytes // *Blood.*– 1993.– Vol. 81, N7.– P. 655-656.
12. *Harris D.A.* Spectrophotometric assays // In: *Spectrophotometry and spectrofluorimetry.*– Washington: IRL Press, 1987.– P. 49-90.

*Accepted in 13.09.2005.*