

У зв'язку з цим робились неодноразові спроби зменшити інтенсивність цього процесу введенням до середовища кріоконсервування антиоксидантів різного походження (токоферолі, іонол, відновлений глутатіон та інш.). У науковій літературі є відомості про те, що більшості класичних кріопротекторів притаманна певна антиоксидантна активність. Тому при розробці нових кріозахисних середовищ перш, ніж використовувати відомі антиоксиданти, слід вивчити антирадикальну активність кріопротекторів.

Нами було проведено дослідження впливу інтра- та екстрацелюлярних кріопротекторів на рівень спонтанного та індукованого іонами заліза перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у системі "тромбоцити-плазма", їх спроможності до перехоплення гідроксильного радикала у модельній системі його генерації (деоксирибоза- $H_2O_2$ - $FeCl_3$ ). Інтенсивність ПОЛ вивчали по вмісту гідроперекисів ліпідів та швидкості накопичення ТБК-активних продуктів у реакційному середовищі (трис- $HCl$ -буфер, рН 7,4 – іони заліза) протягом години спектrophотометричним методом.

Встановлено, що 50%-е перехоплення гідроксильного радикала оксидетильованим гліцерином зі ступенем полімеризації 5 (ОЕГ, n=5) мало місце при концентрації 0,5 мг/мл проти 30% інгібування гліцерином. Досліджені речовини за спроможністю перехоплювати гідроксильні радикали можна розмістити у порядку зростання таким чином: гліцерин; ДМСО; ОЕГ, n=5. Поряд з цим виявлено, що вищезгадані кріопротектори суттєво не впливають на рівень вмісту гідроперекисів ліпідів у системі "тромбоцити-плазма" протягом обраного часу експозиції та жоден з кріопротекторів не запобігає підвищенню рівня ПОЛ після індукції іонами заліза. Спостерігалися відмінності у зміні розвитку реакцій ПОЛ за умов їх індукції іонами заліза в присутності різних кріопротекторів. Величини досліджуваних параметрів залежали від концентрації кріопротектора.

За результатами модельних експериментів можна припустити, що досліджені кріопротектори відносяться до "істинних" антиоксидантів, або "пасток" вільних радикалів (за сучасною класифікацією). Одержані дані дозволяють з'ясувати деякі аспекти молекулярних механізмів захисної дії кріопротекторів і можуть бути використані у розробці нових кріозахисних середовищ для консервування компонентів крові.

antioxidants of different origin (tocopherol, ionol, reduced glutathione etc.) into cryopreservation medium. There are available data in scientific literature about the fact that the majority of classic cryoprotectants has a certain antioxidant activity. Therefore when developing a new cryoprotective medium it should be reasonable to study antiradical activity of cryoprotectants first, rather than to use known antioxidants.

We have studied the effect of intra-, extracellular cryoprotectants at the level of spontaneous and induced by iron ions lipid peroxidation (LPO) in platelets-plasma system, their ability for capturing hydroxyl radical in model system of its generation (deoxyribose- $H_2O_2$ - $FeCl_3$ ). LPO intensity was studied on content of lipid hydroperoxide and rate accumulation of TBA-active products in reaction medium (tris- $HCl$ -buffer-iron ions) during an hour with spectrophotometric method.

It was established that 50% hydroxyl radical capturing by oxyethylated glycerol with 5 polymerization degree (OEG, n=5) took place with the concentration of 0.5mg/ml versus 30% inhibition by glycerol.

Studied substances could be placed in an ascending row: glycerol; DMSO; OEG, n=5. In addition it was found that the above-mentioned cryoprotectants did not affect the level of lipid hydroperoxide content in 'platelets-plasma' system during chosen exposure time and no cryoprotectants prevented a rise of LPO level after induction by iron ion. There were the differences of development change in LPO reactions in condition of their induction by iron ions with the presence of various cryoprotectants.

Values of researched parameters were dependent on cryoprotectant concentration.

On the results of model experiments we can suppose that studied cryoprotectants are referred to 'true' antioxidants or 'traps' of free radicals (according to current classification). Obtained data enable to find out some aspects of molecular mechanisms of protective action of cryoprotectants and may be used in developing new cryoprotective media for preservation of blood components.

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

И.А. ЖЕЛТЯКОВА<sup>1</sup>, Е.В. БРОВКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский государственный медицинский университет

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## **Effect of Hypothermic Storage Before and After Cryopreservation on Nucleated Component Properties as a Part of Whole Cord Blood**

I.A. ZHELTYAKOVA<sup>1</sup>, E.V. BROVKO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kharkov State Medical University

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Цель работы – изучение свойств ядерных клеток кордовой крови человека (ККЧ) в зависимости от срока гипотермического хранения до и после криоконсервирования.

The work was targeted to investigate the properties of human cord blood (HCB) nuclear cells depending on hypothermic storage term before and after cryopreservation.

Объектом исследования служили образцы кордовой крови человека. Кровь криоконсервировали в пластиковых контейнерах по оптимальной для кроветворных клеток программе, а хранили до и после криоконсервирования при 4°C. В образцах крови определяли количество ядерных и сохранных клеток, клеточный спектр и фагоцитарную активность.

Через 24 ч хранения количество ядерных клеток составляло  $(1,2 \pm 0,3) \times 10^7$ , сохранных – 95-98%. Через 48 ч гипотермического хранения количество ядерных и сохранных клеток не изменялось.

После криоконсервирования крови через 24 ч хранения количество ядерных и сохранных клеток не изменялось. Достоверно возрастало количество недифференцированных клеток, появлялись фибробласты. Криоконсервирование ККЧ через 48 ч хранения привело к снижению количества сохранных клеток до  $40 \pm 2\%$ , количество ядерных клеток и клеточный спектр не изменялись. На протяжении 17 ч гипотермического хранения отогретых образцов ККЧ не изменялось количество ядерных и сохранных клеток, лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и недифференцированных клеток. Наблюдалось увеличение количества фибробластов. Через 24 ч хранения деконсервированной крови не изменялось количество ядерных клеток, нейтрофилов, моноцитов и недифференцированных клеток. Отмечалось снижение количества сохранных клеток и лимфоцитов.

При изучении фагоцитарной активности моноцитомacroфагов было выявлено, что через 24 ч хранения фагоцитарный индекс составлял  $78 \pm 3\%$ , количество микробов, поглощенных одной клеткой –  $8,5 \pm 1,3$ . Количество клеток в стадии аттракции –  $11 \pm 7,5$ . Через 48 ч хранения процент фагоцитирующих клеток, фагоцитарное число и количество клеток, способных к аттракции, не изменялись. Криоконсервирование крови через 24 ч хранения ведет к снижению фагоцитарной активности: фагоцитарный индекс и количество поглощенных одной клеткой микробов при этом составляют соответственно  $9 \pm 4$  и  $2,8 \pm 0,7\%$ . Количество клеток в стадии аттракции возрастает до  $58 \pm 4\%$ . Криоконсервирование крови через 48 ч хранения также ведет к снижению фагоцитарной активности: фагоцитарный индекс составляет  $7 \pm 2\%$ , количество микробов, поглощенных одной клеткой, –  $2,1 \pm 0,4$ . Количество клеток в стадии аттракции –  $60 \pm 3\%$ . К 24 ч хранения деконсервированной крови фагоцитарный индекс составил  $9 \pm 2\%$ , количество микробов, поглощенных одной клеткой, –  $2 \pm 0,5$ . Количество клеток в стадии аттракции –  $68 \pm 4\%$ .

Полученные результаты явились научным обоснованием технологического процесса криоконсервирования кордовой крови человека без изменения свойств ядерных компонентов, что позволило использовать ее как модель для разработки методов криоконсервирования крови человека для определения клеточного иммунитета.

Определение сроков гипотермического хранения кордовой крови позволило разработать требования к ее заготовке для приготовления лейкоконцентрата кордовой крови (“Гемокорд”), который представляет собой взвесь стволовых кроветворных и некроветворных клеток в аутологичной плазме.

Samples of human cord blood were taken as investigation object. Blood was cryopreserved in plastic containers according to an optimal program for hemopoietic cells and stored before and after cryopreservation at 4°C. Amount of nucleated and integral cells, cellular spectrum and phagocytic activity were determined in blood samples.

In 24 hrs storage the amount of nucleated cells made  $1.2 \times 10^7 \pm 0.3$  and 95-98% for integral ones. In 48 hrs of hypertonic storage the amount of nucleated and integral cells did not statistically and significantly change.

After blood cryopreservation in 24 hrs of storage the amount of nucleated and integral cells did not change. There was statistical and significant increase in the amount of non-differentiated cells, fibroblasts appeared. HCB cryopreservation in 28 hrs of storage resulted in a decrease in integral cell amount down to  $40 \pm 2\%$ , but there was no change in the amount of nuclear cells and cellular spectrum. During 17 hrs of hypothermic storage of thawed HCB samples there was no change in the amount of nucleated and integral cells, lymphocytes, neutrophils, monocytes and non-differentiated cells. An increase in fibroblast number was noted. In 24 hrs storage of frozen-thawed blood the amount of nuclear cells, neutrophils, monocytes and non-differentiated cells did not change. A decrease in integral cell and lymphocyte amount was noted.

When studying phagocyte activity of monocytes-macrophages the phagocyte index was found out to be  $78 \pm 3\%$  in 24 hrs storage, the microbe amount, sorbed by one cell made  $8.5 \pm 1.3$ . Cell number in attraction stage was  $11 \pm 7.5$ . In 48 hrs storage the percentage of phagocytic cells, phagocyte number and the amount of cells, capable of attracting did not change. Blood cryopreservation in 24 hrs storage results in a decrease in phagocyte activity: phagocyte index and a number of absorbed microbes by one cell makes  $9 \pm 4$  and  $2.8 \pm 0.7\%$ , correspondingly. Cell number in attraction stage augments up to  $58 \pm 4\%$ . Blood cryopreservation in 48 hrs storage also results in the reduction of phagocyte activity: phagocyte index makes  $7 \pm 2\%$ , microbe number, absorbed by one cell is  $2.1 \pm 0.4$ . Cell number in attraction stage was  $60 \pm 3\%$ . To 24-hrs of storage of frozen-thawed blood a phagocyte index makes  $9 \pm 2\%$ , microbe number, absorbed by one cell was  $2 \pm 0.5$ . Cell number in attraction stage made  $68 \pm 4\%$ .

The result obtained was scientific substantiation for technological process of cord blood cryopreservation without changing properties of nucleated components, that enabled its usage as a model for developing methods of human blood cryopreservation to determine their cell immunity.

Determination of terms for cord blood hypothermic storage enabled elaboration of requirements to its procurement for producing human cord blood leucoconcentrate “Hemocord”, being stem hemopoietic and non-hemopoietic cells suspension in autologous plasma.