

**Криоконсервирование цельной кордовой крови****Cryopreservation of Whole Cord Blood**

В последнее время кордовую кровь (КК) используют как источник гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для лечения различных патологий [4, 5]. Преимуществами клеток КК являются относительная простота получения, высокий пролиферативный потенциал и “наивность” Т-клеточного звена трансплантата в отличие от ГСК, выделенных из костного мозга.

В работах [5, 6] показано, что использование КК без фракционирования обеспечивает максимально выраженный терапевтический эффект, поскольку на сохранность кроветворных предшественников влияют манипуляции, связанные со сложным технологическим процессом криоконсервирования. Прежде всего, это связано с сепарационными процедурами, которые уменьшают количество и ухудшают качество гемопоэтических предшественников. Кроме того, при выделении гемопоэтических клеток в отдельную фракцию может снизиться эффективность приживления образца за счет удаления аксессуарно-регуляторных клеточных популяций, определяющих его функциональную полноценность [1].

Для сохранения биологически полноценного состояния КК в период между ее заготовкой и введением в организм реципиента используют технологию криоконсервирования. Сохранение при криоконсервировании в КК ядродержащих клеток и эритроцитов является достаточно сложной задачей. Во-первых, при криоконсервировании эритроцитов и ядродержащих клеток эффективны разные типы криопротекторов и режимы замораживания; во-вторых, использование при криоконсервировании цельной КК проникающих криопротекторов не обеспечивает сохранение в препарате биологически активных веществ плазмы, поскольку необходимо ее отмывание от криопротектора. Поэтому для криоконсервирования цельной КК важна разработка безотмывочных методов криоконсервирования с применением непроникающих в клетку криопротекторов.

Цель работы – провести исследования по разработке безотмывочного метода криоконсервирования

Recently the cord blood (CB) has been used as a source of hemopoietic stem cells (HSC) for the treatment of different pathologies. Advantages of CB cells are relative simplicity of deriving, high proliferative potential and “naivete” of T-cell link of transplant in contrary to HSC, isolated from bone marrow.

It was shown [5, 6] that the CB use without fractionation provides the maximum expressed therapeutic effect, because on integrity of hematogenic precursors the manipulations, associated with complex cryopreservation technologic process affect. First of all, it has been associated with the separating procedures which reduce the amount and diminish the quality of hemopoietic precursors. In addition at isolating of hemopoietic cells as a separate fraction the efficiency of sample grafting may reduce due to removal of accessory-regulatory cell populations, determining its functional integrity [1].

For preserving the CB biological integrity in the period between its preparing and injection to recipient organism the technology of cryopreservation is used. The preserving during cryopreservation in CB of nucleated cells and erythrocytes is quite difficult problem. Firstly, at the cryopreservation of erythrocytes and nucleated cells different types of cryoprotectants and freezing regimens are effective; secondly, using the penetrating cryoprotectants in whole CB cryopreservation does not provide the integrity of biologically active substances of sample plasma, because its washing-out of cryoprotectant is necessary. Therefore for cryopreservation of whole CB the development of cryopreservation methods without washing-out with application of nonpenetrating in cell cryoprotectants is important.

The research aim was to carry out the investigations for designing of cryopreservation method without washing-out for whole cord blood to preserve integrity of cells of different types in it (erythrocytes, nucleated cells) as well as biologically active substances of plasma.

**Materials and methods**

Human CB preserved with glucose-citrate solution was used in researches. As a cryoprotectant 30% poly-

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ния цельной кордовой крови с целью сохранения в ней клеток разного типа (эритроцитов, ядросодержащих клеток) и биологически активных веществ плазмы.

### Материалы и методы

В работе использовали КК человека, заготовленную на глюкозо-цитратном растворе. В качестве криопротектора применяли 30%-й полиэтиленгликоль м. м. 1500 (ПЭГ-1500), приготовленный на физиологическом растворе NaCl и 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,4). Криопротектор добавляли согласно методу “холодовой обработки” 1:1 по объему [2]. Для сравнения использовали кровь, обработанную при комнатной температуре. Образцы замораживали до  $-196^{\circ}\text{C}$  по специально разработанной нами программе [3], оттаивание проводили при  $40-42^{\circ}\text{C}$  в водяной бане. После размораживания цельной КК определяли уровень гемолиза и основные структурно-функциональные показатели эритроцитов (АТФ, 2,3-ДФГ), а также оценивали модификацию белков мембрано-цитоскелетного комплекса (МЦК) с использованием белоксшивающего агента (диамида) методом электрофореза в ПААГ. Биологически активные вещества плазмы КК определяли методом иммуноферментного анализа. Исследования ядросодержащих клеток ( $\text{CD45}^+$ ) КК, в том числе и ГСК ( $\text{CD34}^+$ ), проводили методом проточной цитофлуориметрии по международному ISHAGE протоколу.

### Результаты и обсуждение

В предыдущих работах мы показали, что среди непроникающих криопротекторов наиболее эффективным для криозащиты эритроцитов донорской крови человека является ПЭГ-1500. При разработке безотмывочного метода криоконсервирования цельной КК с ПЭГ-1500 путем варьирования скоростями охлаждения и температурой экспозиции в условиях умеренно низких температур мы использовали оптимальный режим замораживания, обеспечивающий высокую сохранность эритроцитов (до 96%) и основных их функциональных показателей (АТФ и 2,3-ДФГ) на уровне контроля. Биологически активные вещества плазмы (трийодтиронин, тироксин, тиреотропный гормон, тестостерон и  $\alpha$ -фетопротеин) полностью сохранялись после криоконсервирования.

В устойчивости эритроцитов к факторам криоконсервирования важную роль играют белки МЦК. Характер их модификаций под влиянием криопротектора и замораживания-отогрева можно адекватно оценить методом электрофореза в ПААГ с помощью диамида, который обладает способностью формировать дисульфидные мостики между SH-группами белков, находящимися на расстоянии, доступном для действия диамида. В резуль-

ethylenglycol, m.m. 1500 (PEO-1500), prepared with NaCl physiological solution and 0.01 mM phosphate buffer (pH 7.4), was applied. The cryoprotectant was added according to the “cold treatment” method in 1:1 v/v ratio [2]. For comparison the blood obtained at room temperature was used. The samples were frozen down to  $-196^{\circ}\text{C}$  for specially evolved program [3], thawing was carried out at  $40-42^{\circ}\text{C}$  in water bath. After freeze-thawing of whole CB the hemolysis level and basic structure and function indices of erythrocytes (ATP, 2,3-DPG) was determined, and modification of proteins of membrane-cytoskeletal complex (MCC) using protein-coupling agent (diamide) by electrophoresis in PAAG was estimated. Biologically active substances of CB plasma were determined by immunoenzyme analysis. The researches of nucleated cells ( $\text{CD45}^+$ ) including CB, HSC ( $\text{CD34}^+$ ), were carried out by flow cytofluorometry according to international ISHAGE protocol.

### Results and discussion

In previous researches we have shown, that among non-penetrating cryoprotectants the most effective for cryoprotection of human donor blood erythrocytes was PEG-1500. When developing the washing-out cryopreservation method of whole CB with PEG-1500 by varying cooling rates and exposure temperature in conditions of moderate low temperatures we used optimal freezing regimen, which provides high integrity of erythrocytes (up to 96%) and their basic functional indices (ATP and 2.3 DPG) on the control level. Biologically active substances of plasma (triiodothyronine, thyroxin, thyrotropic hormone, testosterone and alpha-fetoprotein) were completely preserved after cryopreservation.

In erythrocytes' resistance to cryopreservation factors the MCC proteins play an important role. Their modification under effect of cryoprotectant and freeze-thawing may be equally estimated by electrophoresis in PAAG with diamide, having a capacity to form disulfide bridges between SH-groups of the proteins are, being at a distance accessible for diamide. As a result of SH-groups proteins oxygenation the aggregate complexes appear which are manifested in electrophoregrams, as a high molecular fraction of proteins on gel start. We have shown that in CB erythrocytes, frozen by the developed by us method with “cold treatment” before and after freeze-thawing the aggregates' number was significantly lower ( $4.5\pm 0.9$  and  $5.8\pm 0.8\%$  correspondingly), if compared with treatment at room temperature ( $6.5\pm 0.9$  and  $5.8\pm 0.8\%$ , correspondingly). It should be noted that in the control erythrocytes the number of protein aggregates made  $3.3\pm 0.4\%$ .

When investigating the nucleated cells ( $\text{CD45}^+$ ) of CB, hemopoietic ( $\text{CD45}^+ \text{CD45}^+$ ), prior to and after freezing-thawing it has been established that developed cryopreservation method for whole CB enables

тате окисления SH-групп белков возникают агрегатные комплексы, которые проявляются на электрофореграммах в виде фракции высокомолекулярных белков на старте геля. Мы показали, что у эритроцитов КК, замороженной по разработанному нами методу с использованием “холодовой обработки”, до и после размораживания количество агрегатов было достоверно меньше ( $4,5 \pm 0,9$  и  $5,8 \pm 0,8\%$  соответственно) по сравнению с обработкой при комнатной температуре ( $6,6 \pm 0,4$  и  $13,6 \pm 1,9\%$  соответственно). Следует отметить, что в контрольных эритроцитах количество белковых агрегатов составляло  $3,3 \pm 0,4\%$ .

При исследовании ядродержащих клеток ( $CD45^+$ ) КК, в том числе и гемопоэтических ( $CD45^+CD34^+$ ), до и после размораживания установлено, что разработанный метод криоконсервирования цельной КК позволяет сохранять после размораживания до 70%  $CD45^+$ -клеток. Анализ субпопуляционного состава лейкоцитов после размораживания выявил перераспределение соотношения между лимфоцитами, моноцитами и гранулоцитами (рисунок). Если до криоконсервирования содержание данных популяций составляло в среднем 38, 11 и 51%, то после размораживания – 63, 18 и 19% соответственно. Можно заключить, что сохранность лейкоцитов снижается в основном за счет гибели гранулоцитов.

Сохранность ГСК составляла до 85%, что может свидетельствовать об их большей криоустойчивости по сравнению с  $CD45^+$ -клетками.

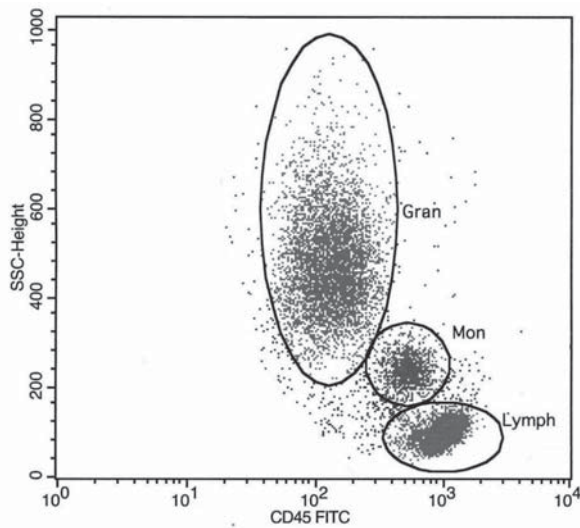
to preserve up to 70% of  $CD45^+$  cells after freezing-thawing. Analysis of composition of leukocyte subpopulation after freeze-thawing found out the redistribution of ratio among lymphocytes, monocytes and granulocytes (Figure). If content of these populations prior to cryopreservation made in average 38, 11, 51%, then they were 63, 18 and 19% after freeze-thawing, correspondingly. It is possible to conclude, that leukocyte survival is reduced due to granulocytes' death. HSC integrity made up to 85% that may indicate their higher cryostability in comparison with  $CD45^+$  cells.

Determining of cell integrity is important, but insufficient test, if the structure is kept, a cell may be not viable. Therewith we carried out the analysis of nucleated CB cells viability with using of 7-actinomycine D. Analysis of  $CD45^+$  and  $CD34^+$  cells' viability after cryopreservation by developed method has shown that in viable state are preserved up to 85.3% of  $CD45^+$  cells and up to 90% of  $CD34^+$  cells. It should be noted that  $CD45^+$  cells' viability reduces due to granulocytes, which population viability made 50%. The viability of lymphocyte-monocyte population diminishes by 3–7%.

It has been established, that integrity and viability of CB cells, treated with PEG-1500 at room temperature, were significantly low in comparison with the suggested by us method.

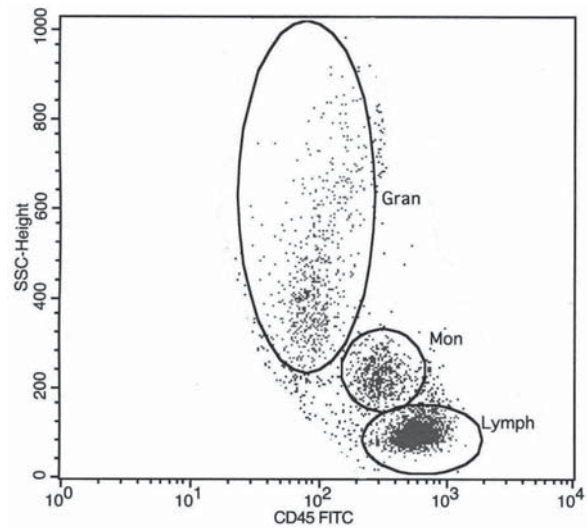
### Conclusions

The obtained results testify to the fact, that designed cryopreservation method without washing out for



X Parameter: CD 45 FITC	
Y Parameter: SSC-Height	
Region	%Gated
Lymph	36.58
Mon	11.39
Gran	47.72

a



X Parameter: CD 45 FITC	
Y Parameter: SSC-Height	
Region	%Gated
Lymph	56.88
Mon	15.12
Gran	18.43

a б

b

Популяционный состав лейкоцитов до (а) и после (б) криоконсервирования.  
Content of leukocyte population prior to (a) and after (b) cryopreservation.

Определение сохранности клеток является важным, но недостаточным тестом, поскольку при сохранении структуры клетка может быть нежизнеспособной. В связи с этим мы провели анализ жизнеспособности ядродержащих клеток КК с применением 7-актиномина Д. Анализ жизнеспособности CD45<sup>+</sup>- и CD34<sup>+</sup>-клеток после криоконсервирования по разработанному нами методу показал, что в жизнеспособном состоянии сохраняется до 85,3% CD45<sup>+</sup>-клеток и до 90% – CD34<sup>+</sup>-клеток. Следует отметить, что жизнеспособность CD45<sup>+</sup>-клеток снижается за счет гранулоцитов, жизнеспособность популяции которых составляла 50%. Жизнеспособность лимфоцитарно-моноцитарной популяции уменьшается на 3–7%.

Установлено, что сохранность и жизнеспособность клеток КК, обработанной ПЭГ-1500 при комнатной температуре, были достоверно ниже по сравнению с предложенным нами методом.

### Выводы

Полученные результаты свидетельствуют, что разработанный безотмывочный метод криоконсервирования цельной кордовой крови обеспечивает в препарате высокую сохранность и жизнеспособность эритроцитов, ядродержащих клеток (в том числе и ГСК), а также биологически активных веществ плазмы кордовой крови.

whole cord blood provides high integrity and viability in the samples of erythrocytes, nucleated cells (HSC included) and biological activity substances of cord blood plasma.

### References

1. *Goltsev A.N., Kalinichenko T.A.* Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for a clinical application. Part 1. Characteristic of hemopoietic potential // *Problems of Cryobiology.*– 1998.– N1.– P. 3–24.
2. *Patent № 30888A Ukraine, IPC 6A 01 N 1/02.* Cryopreservation method of erythrocytes/ L.O. Babiychuk, V.I. Grischenko, S. Sumida, V.A. Bondarenko, N.G. Zemlyanskikh, T.P. Bondarenko. Applied 16.06.98. Publ. 15.12.2000. Bul. №7.
3. *Patent № 80062 Ukraine, IPC A 01 N 1/02.* Cryopreservation method of whole cord blood/ Babiychuk L.O., Grischenko V.I., Gurina T.M., Ryazantsev V.V., Zubova O.L., Zubov P.M., №200602122; Applied 27.02.06. Publ. 10.08.07. Bul. №12.
4. *Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1989.– Vol. 86, N10.– P. 3828–3832.
5. *Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al.* Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking // *Bone Marrow Transplant.*– 1992.– Vol. 9, N1.– P. 114–117.
6. *Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W., Stevens C.E.* Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // *Blood.*– 1993.– Vol. 81, N7.– P. 1679–1690.

*Accepted in 13.05.2008*

### Литература

1. *Гольцев А.Н., Калиниченко Т.А.* Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 1. Характеристика гемопоэтического потенциала // *Пробл. криобиологии.*– 1998.– №1.– С.3–24.
2. *Патент України №30888А МПК 6А01N1/02.* Спосіб консервування еритроцитів / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, С. Суміда, В.А. Бондаренко, Н.Г. Землянських, Т.П. Бондаренко. Заявл. 16.06.98; Опубл. 15.12.2000.– Бюл. №7.
3. *Патент України № 80062 МПК А01N 1/02.* Спосіб криоконсервування цільної кордової крові / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна, В.В. Рязанцев, О.Л. Зубова, П.М. Зубов.– №200602122; Заявл. 27.02.06; Опубл. 10.08.07.– Бюл. №12.
4. *Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1989.– Vol. 86, N10.– P. 3828–3832.
5. *Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al.* Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking // *Bone Marrow Transplant.*– 1992.– Vol. 9, N1.– P. 114–117.
6. *Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W., Stevens C.E.* Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // *Blood.*– 1993.– Vol. 81, N7.– P. 1679–1690.

*Поступила 13.05.2008*