

## Эффективность применения линейной и экспоненциальной программ замораживания лейкоцитов до $-80^{\circ}\text{C}$

А.Н. ХУДЯКОВ<sup>1</sup>, Е.П. СВЕДЕНЦОВ<sup>1</sup>, Т.В. ТУМАНОВА<sup>1</sup>, А.А. КОСТЯЕВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

<sup>2</sup>Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий

## Efficiency of Applying Linear and Exponential Programs for Leukocyte Freezing Down to $-80^{\circ}\text{C}$

A.N. KHUDYAKOV<sup>1</sup>, E.P. SVEDENTSOV<sup>1</sup>, T.V. TUMANOVA<sup>1</sup>, A.A. KOSTYAEV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physiology of Komi Scientific Center of Ural Division of Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

<sup>2</sup>Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Russia

В настоящее время для замораживания клеток крови и костного мозга широко используются линейные программы, тогда как раньше ряд авторов [Гордиенко Е.А. и соавт., 1994; Сведенцов Е.П. и соавт., 1987; Костяев А.А. и соавт., 2003] предложили применять и экспоненциальные. Цель данного исследования – изучение эффективности применения линейной и экспоненциальной программ замораживания лейкоцитов до  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Объектом исследования служил концентрат лейкоцитов, выделенный из цельной донорской крови при цитаферезе. Использовали оригинальный малотоксичный хладоограждающий раствор (Пат. № 2290808, 2007), содержащий криопротектор смешанного действия гексаметиленбистетраоксизтилмочевину, криопротектор эндоцеллюлярного действия ДМСО и “реставрирующую” добавку широкого спектра действия. Биообъект смешивали с раствором в соотношении 1:1 и выдерживали при комнатной температуре 20 мин. Замораживание проводили по двум программам: экспоненциальной (серия 1) и линейной (серия 2). В серии 1 контейнер с лейкоцитами погружали в заполненную хладоносителем (96% этиловым спиртом) ванну камеры электроморозильника (объем 4 л) “Криостат”. Клеточную взвесь выдерживали при  $-28^{\circ}\text{C}$  (температура адаптации) в течение 15–18 мин в зависимости от объема среды и переносили для дальнейшего замораживания и хранения в электроморозильник ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). В серии 2 контейнер с лейкоцитами помещали в программный замораживатель УОП и замораживали биообъект по следующей программе: на 1-м этапе со скоростью  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  от  $22$  до  $-7^{\circ}\text{C}$ , на 2-м этапе –  $-10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  от  $-7$  до  $-40^{\circ}\text{C}$ , на 3-м этапе –  $-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  от  $-40$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ . Образцы хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение суток в электрическом морозильнике, отогревали в водяной ванне при  $38^{\circ}\text{C}$  в течение 35–50 с при интенсивном покачивании контейнера.

Установлено, что количество клеток, устойчивость их мембран к витальному красителю эозину, содержание лизосомально-катионных белков в нейтрофилах после отогрева в сериях 1 ( $n=12$ ) и 2 ( $n=12$ ) достоверно ( $p<0,05$ ) не отличаются. При оценке морфологического состава лейкоцитов, замороженных по линейной программе, количество гранулоцитов составило  $87,5\pm 6,55\%$  (от исходного уровня), а при использовании экспоненциальной – достоверно выше ( $94,5\pm 6,9\%$ ), однако фагоцитарная активность нейтрофилов данной серии была ниже ( $78,13\pm 5,9\%$ ), чем в серии с применением линейной программы ( $88,9\pm 5,41\%$ ).

Следовательно, линейная и экспоненциальная программы замораживания лейкоцитов до  $-80^{\circ}\text{C}$  с применением криоконсерванта по эффективности значительно не отличаются, но экспоненциальная программа имеет низкую экономическую стоимость и является более доступной в методическом плане.

Nowadays there are widely used the linear programs for blood and bone marrow cell freezing, meanwhile some authors [Gordienko E.A. *et al.*, 1994; Svedentsov E.P. *et al.*, 1987; Kostyaev A.A. *et al.*, 2003] previously proposed to use the exponential programs as well. This research aim was to study the efficiency of applying the linear and exponential programs for erythrocyte freezing down to  $-80^{\circ}\text{C}$ .

The research object was the leukocyte concentrate, isolated from the whole donor blood under cytopheresis. We used the original low toxic cold-protecting solution (Patent N 2290808, 2007), containing hexamethylene-bis-tetraoxyethyl-urea cryoprotectant of mixed effect, DMSO cryoprotectant of endocellular effect and a “renewing” additive of wide spectrum. Bioobjects were mixed with solution in 1:1 ratio and exposed at room temperature for 20 min. Freezing was carried-out by two programs: exponential (1<sup>st</sup> series) and linear (2<sup>nd</sup> series) ones. In the 1<sup>st</sup> series the container with leukocytes was immersed into the bath of “Kriostat” electrofreezer chamber (4 l volume), filled with coolant (96% ethyl alcohol) bath. Cell suspension was exposed at  $-28^{\circ}\text{C}$  (adaptation temperature) within 15–18 min depending on the medium volume and transferred into electrofreezer at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further freezing and storage. In the 2<sup>nd</sup> series the container with leukocytes was placed into the UOP programmed freezer and the bioobject was frozen according to the following program: at the 1<sup>st</sup> step with  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  rate from  $22$  to  $-7^{\circ}\text{C}$ , at the 2<sup>nd</sup> step with  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  from  $-7$  to  $-40^{\circ}\text{C}$ , and with  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  from  $40$  to  $-80^{\circ}\text{C}$  at the 3<sup>rd</sup> one. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 1 day in electric freezer, thawed with water bath at  $38^{\circ}\text{C}$  for 35–50 sec under intensive shaking of container.

The number of cells, their membrane resistance to eosin vital dye, content of lysosome-cation proteins in neutrophils after thawing in 1<sup>st</sup> ( $n=12$ ) and 2<sup>nd</sup> ( $n=12$ ) series were established as not statistically and significantly differed ( $p<0.05$ ). When estimating a morphologic composition of leukocytes, frozen by a linear program, the granulocyte number was  $87.5\pm 6.55\%$  (of initial level), and with the exponential one it was statistically and significantly higher ( $94.5\pm 6.9\%$ ), but neutrophil phagocyte activity in these series was lower ( $78.13\pm 5.9\%$ ), than in the series with linear program ( $88.9\pm 5.41\%$ ).

Consequently, the linear and exponential programs for leukocyte freezing down to  $-80^{\circ}\text{C}$  with cryopreservative do not considerably differ by the efficiency, but the exponential program has low economic value and is more available in methodical aspect.