

## Оценка состояния различных популяций ядросодержащих клеток кордовой и донорской крови в зависимости от метода их криоконсервирования

UDC

L.A. BABYCHUK, O.A. MIKHAYLOVA\*, P.M. ZUBOV, V.V. RYAZANTSEV

### Assessment of Status of Different Nucleated Cell Populations of Cord and Donor Blood Depending on Their Cryopreservation Method

Оценивали сохранность и жизнеспособность популяций ядросодержащих клеток (ЯСК) кордовой и донорской крови в зависимости от метода криоконсервирования. Показано, что выделение клеток с помощью полиглобулина и последующее их замораживание под защитой 5% ДМСО, а также выделение ЯСК методом двухэтапного центрифугирования с последующим замораживанием под защитой 10% ПЭО-1500 позволяют сохранить количество и жизнеспособность клеток на достаточно высоком уровне. Основное снижение как сохранности, так и жизнеспособности ЯСК независимо от используемой технологии криоконсервирования происходит за счет популяции гранулоцитов, а лимфоциты и моноциты остаются более устойчивы к повреждающим факторам криоконсервирования. Было показано, что мононуклеарные клетки кордовой крови более устойчивы к повреждающим факторам криоконсервирования, чем более зрелые клетки донорской крови, что проявляется в существенных отличиях показателей жизнеспособности клеток практически во всех случаях до и после их криоконсервирования.

**Ключевые слова:** ядросодержащие клетки, кордовая и донорская кровь, криопротекторы, ДМСО, ПЭО-1500, криоконсервирование.

Оцінювали збереженість і життєздатність популяцій ядромісних клітин (ЯВК) кордової та донорської крові залежно від методу криоконсервування. Показано, що виділення клітин за допомогою поліглобуліну і подальше їх заморожування під захистом 5% ДМСО, а також виділення ЯВК методом двохетапного центрифугування з наступним заморожуванням під захистом 10% ПЕО-1500 дозволяють зберегти кількість і життєздатність клітин на досить високому рівні. Основне зниження як збереженості, так і життєздатності ЯВК незалежно від використаної технології криоконсервування відбувається за рахунок популяції гранулоцитів, а лімфоцити і моноцити є більш стійкі до пошкоджень факторами криоконсервування. Було показано, що мононуклеарні клітини кордової крові більш стійкі до пошкоджень факторами криоконсервування, ніж більш зрілі клітини донорської крові, що проявляється в суттєвих відмінностях показників життєздатності клітин практично у всіх випадках до і після їх криоконсервування.

**Ключові слова:** ядромісні клітини, кордова і донорська кров, криопротектори, ДМСО, ПЕО-1500, криоконсервування..

Quantity and viability of nucleated cell (NC) populations of cord and donor blood was assessed after implementation of various cryopreservation method. It has been shown that isolation of cells by polyglukin and their following freeze-thawing under 5% DMSO protection as well as isolation of NCs by two-step centrifugation with following freeze-thawing under 10% PEO-1500 protection allows the preservation of a quantity and viability of cells at quite a high level. Basic reduction of both quantity and viability of NCs independently on the cryopreservation methods used occurs on account of the population of granulocytes, lymphocytes and monocytes occurred to be more resistant to damaging cryopreservation factors. Mononuclear cells of cord blood were shown to be more resistant to damaging cryopreservation factors unlike mature cells of adult donor blood that was manifested in significant differences of the indices of cell viability virtually in all cases prior to and after their cryopreservation.

**Key words:** nucleated cells, cord and donor blood, cryoprotectants, DMSO, PEO-150, cryopreservation.

В последние десятилетия для лечения различных заболеваний системы крови все чаще используют гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) из кордовой крови (КК) и периферической крови взрослых доноров (ДК) [6–8, 13, 14].

Использование фракции гемопоэтических стволовых клеток, которые входят в состав ядросодержащих клеток (ЯСК), стало предпосылкой к созданию банков крови, в которых образцы хранятся в жидком азоте (при  $-196^{\circ}\text{C}$ ) в течение длитель-

During recent decades to treat different diseases of blood system the hemopoietic stem cells (HSCs) derived from cord blood (CB) and adult donor peripheral blood (DPB) have been used more and amore often [6–8, 13, 14].

Application of the fraction of hemopoietic stem cells being the part of nucleated cells (NCs) has become the pre-condition for establishing the blood banks, where the samples are stored in liquid nitrogen (at  $-196^{\circ}\text{C}$ ) for a long time with no loss of their biological

ного времени без потери их биологических свойств. Однако, несмотря на множество существующих методов криоконсервирования ЯСК крови, проблема сохранения их функциональной активности после замораживания далека от окончательного решения [1, 3, 8, 11].

Учитывая небольшие объемы кордовой крови и трудности, связанные с получением ГСК из донорской, очень важно сохранить максимальное количество ЯСК без потери их пролиферативной активности и жизнеспособности после криоконсервирования. Для этого необходимо разрабатывать новые и усовершенствовать существующие методы криоконсервирования данных клеток.

Технология криоконсервирования ЯСК состоит из нескольких важных этапов. «Дестабилизация» (нарушение нормального биологического ритма) клеток на любом из них может привести к потере функциональной активности, а также их количества после криоконсервирования и, как следствие, несостоятельности заготовленного препарата ЯСК. Цель данного исследования – оценка сохранности и жизнеспособности ЯСК кордовой и донорской крови, а также анализ изменения их популяционного состава после криоконсервирования различными методами.

### Материалы и методы

Объект исследования – ЯСК донорской и кордовой крови человека, заготовленной на глюкозоцитратном растворе. Кордовую кровь получали из вены пульсирующей пуповины после информированного согласия роженицы.

Концентраты (Conc) ЯСК выделяли несколькими методами: методом седиментации в 3%-м полиглокине (Conc1) [2], методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина (Conc2) [9] и по разработанному нами методу двухэтапного центрифугирования цельной крови с последующим получением концентрата ЯСК в аутоплазме (Conc3) [4].

В качестве криопротекторов в работе использовали: диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 5% и полиэтиленоксид с м.м. 1500 (ПЭО-1500) в конечной концентрации 10%, приготовленный на растворе 0,01 М фосфатно-солевого буфера, содержащего 0,15М NaCl, pH 7,4. Концентрат ЯСК Conc1 замораживали как под защитой 5% ДМСО, так и без него. Концентрат ЯСК Conc2 замораживали в присутствии ДМСО или ПЭО-1500. Криоконсервирование ЯСК, полученных двухэтапным центрифугированием (Conc3), проводили под защитой 10% ПЭО-1500. Криопротекторы к суспензии клеток добавляли дозированно при низкой положительной температуре (2...4°C), 1:1 по объему [1].

properties. However, in spite of numerous existing methods for cryopreservation of blood NCs the problem of preserving their functional activity after freeze-thawing is far from being completely solved [1, 3, 8, 11].

Taking into account small volumes of cord blood and the difficulties related to the obtaining of HSCs from blood of adult donor, it is very important to preserve the maximum amount of NCs with no loss of their post-thaw proliferative activity and viability. For this aim it is necessary to develop novel and improve existing methods to cryopreserve these cells.

Cryopreservation technique for NCs consists of several important stages. Cell 'destabilization' (disorder of normal biological rhythm) at any of them may lead to the loss of functional activity of cells and also their number after cryopreservation and as a consequence to the failure of procured preparation of NCs. The aim of this study was to assess the survival rate and viability of cord and donor blood NCs as well as to analyze the changes in their population composition after cryopreservation with different methods.

### Materials and methods

The research objects were NCs of human adult donor and cord blood, procured with glucose-citrate solution. Cord blood was obtained from vein of pulsing umbilical cord after the informed consent of a parturient woman.

Concentrates (Conc) of NCs were isolated with following methods: sedimentation in 3% polyglukin (Conc1) [2], centrifugation in ficoll-verografin density gradient (Conc2) [9] and according to the own method of two-step centrifugation of a whole blood with following obtaining the concentrate of NCs in autoplasm (Conc3) [4].

In the research the following cryoprotectants were used: solutions of dimethyl sulfoxide (DMSO) in a final concentration of 5% and polyethylene oxide with molecular mass of 1500 (PEO-1500) in a final concentration of 10% on a base of 0.01M phosphate buffer, containing 0.15M NaCl, pH 7.4. Concentrate of NCs Conc1 was frozen-thawed both under protection of 5% DMSO and without it. NCs concentrate Conc2 was frozen-thawed in the presence of DMSO or PEO-1500. The NCs obtained with two-step centrifugation (Conc3) were frozen under the protection of PEO-1500. Cryoprotectants were added to cell suspension drop-by-drop at low positive temperature (2...4°C), 1:1 v/v [1].

Afterwards the cell suspension was transferred into 1.8 ml cryovials (Nunc) and was cooled down to -196°C according to previously developed two-step program [5] using programmable freezer Cryoson (Germany). Thawing was performed at 37°C in water bath during constant shaking.

The number of survived NC cells was examined by standard method using Goryaev's chamber. Cell

Затем суспензию клеток переносили в криобирки ("Nunc", США) объемом 1,8 мл и охлаждали до  $-196^{\circ}\text{C}$  согласно ранее разработанной двухэтапной программе [5] на программном замораживателе "Cryoson" (Германия) [5]. Отогрев осуществляли при  $37^{\circ}\text{C}$  на водяной бане при постоянном покачивании.

Количество сохранных ЯСК определяли стандартным методом с помощью камеры Горяева. Сохранность клеток определяли как отношение количества клеток в образце, подвергнутом воздействию, к количеству интактных (до воздействия) клеток, выраженное в процентах.

Фенотипирование ядросодержащих ( $\text{CD}45^{+}$ ) клеток, а также оценку их жизнеспособности с помощью ДНК-маркера 7-аминоактиномицина D (7AAD) проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре "FACS Calibur" ("Becton Dickinson", США) с использованием реагентов "BD" (США). Жизнеспособными считали долю клеток, не окрашенных 7AAD ( $7\text{AAD}^{-}$ ) в оцениваемых образцах. Данные проточной цитометрии оценивали с помощью программного обеспечения "CellQuestPro".

Данные представлены в виде  $M \pm SE$ , достоверность различий между выборками оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с уровнем значимости 5%. Объем выборки составлял не менее 5 экспериментов.

### Результаты и обсуждение

На сегодняшний день криоконсервирование ЯСК является одним из наиболее надежных методов их долгосрочного хранения и состоит из нескольких этапов: выделение фракции ЯСК из цельной крови, обработка клеток криопротектором и замораживание-отогрев. Каждый из этих этапов может быть потенциально опасным для ЯСК, поэтому при разработке наиболее эффективных методов их криоконсервирования с сохранением максимального количества клеток в жизнеспособном состоянии необходимо проводить комплексную оценку их состояния на каждом этапе криоконсервирования.

Проведенные нами ранее исследования структурно-функциональной полноценности ЯСК показали [2], что после их выделения с помощью полиглукина или двухэтапного центрифугирования снижение жизнеспособности ЯСК и изменение в асимметричном распределении фосфолипидов в мембране не наблюдались, а при выделении клеток с помощью фикола, часто используемого в мировой практике [9], отмечались уменьшение жизнеспособности и нарушение асимметрии.

Следующий этап подготовки полученных концентратов ЯСК к замораживанию предполагает их

survival rate was defined as the ratio of cell number in a sample subjected to the effect to the one of intact cells (prior to the effect) expressed in percentage.

Phenotyping of nucleated cells ( $\text{CD}45^{+}$ ) as well as assessment of their viability by means of DNA-marker 7-aminoactinomycin D (7AAD) was performed using FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) and BD reagents. The portion of cells non-stained with 7AAD ( $7\text{AAD}^{-}$ ) in the assessed samples were considered as viable (and expressed in percents as viability). The data of flow cytometry were estimated with CellQuest Pro software.

The data are presented as  $M \pm SE$ , the statistical significance between the samplings was assessed by means of Students t-criterion with significance level 5%. The sampling volume made not less than 5 experiments.

### Results and discussion

Today cryopreservation of NCs is one of the most reliable methods for long-term storage and consists of several stages: isolation of NC fraction from a whole blood, treatment of cells with cryoprotectant and freeze-thawing. Each of these stages may be potentially dangerous for NCs, therefore during developing the most effective methods of their cryopreservation with preserving the maximum amount of the cells in a viable state it is necessary to assess in a combined way their state at every cryopreservation step.

The studies of structural and functional integrity of NCs have shown [2] that after their isolation by means of either polyglukin or two-step centrifugation there were no reduced viability of NCs and no changes in membrane asymmetric distribution of phospholipids, and during isolation of cells with ficoll, frequently used in the world practice [9], there was found the decrease in viability and impaired asymmetry.

Next stage of preparing the obtained concentrates of NCs to freezing requires their treatment with cryoprotective agents, we used a penetrating into a cell DMSO and non-penetrating PEO-1500. The treatment of the cells with these cryoprotectants at low positive temperature allowed the survival of 95% NCs (of their initial number in corresponding concentrates after isolation) both in cord and adult donor blood (Fig. 1).

After freeze-thawing the highest survival of NCs in respect to their initial number in corresponding concentrates after isolation is observed in the cell suspensions obtained with two-step centrifugation (Conc3) and frozen-thawed under the protection of 10% PEO-1500 as well as after isolation of the cells using polyglukin (Conc1) and freeze-thawing with 5% DMSO. These observations are similar both for NCs of cord and adult donor blood. After freeze-thawing of cord and adult donor blood NCs isolated with ficoll (Conc2) we observed a decrease in their survival: when

**Рис. 1.** Сохранность ядросодержащих (CD45<sup>+</sup>) клеток после обработки криопротекторами и замораживания-отогрева: □ – кордовая кровь; ■ – кровь взрослого донора; \* – статистически достоверные отличия между донорской и кордовой кровью ( $p \leq 0,05$ ).

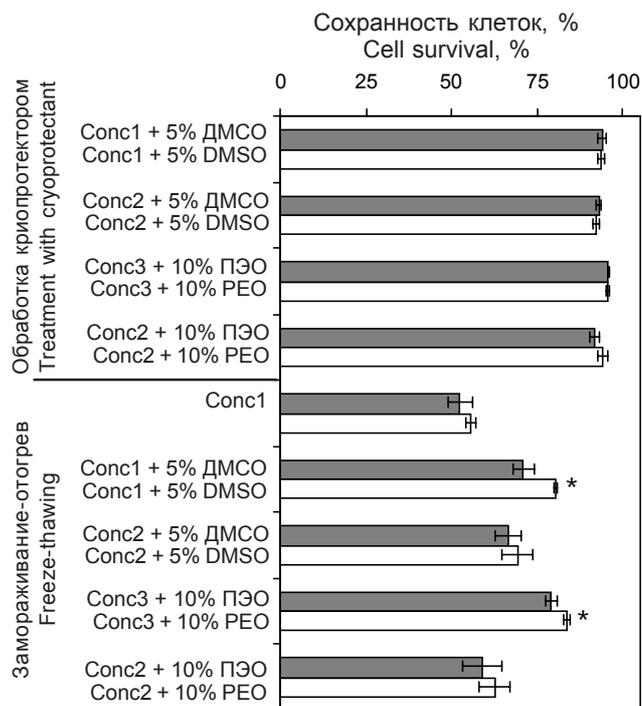
**Fig. 1.** Survival rate of nucleated (CD45<sup>+</sup>) cells after treatment with cryoprotectants and freeze-thawing: □ – cord blood; ■ – adult donor blood; \* – statistically significant differences between donor and cord blood ( $p \leq 0.05$ )

обработку криопротекторными веществами, в качестве которых были использованы проникающий в клетку ДМСО и непроникающий ПЭО-1500. Обработка клеток данными криопротекторами при низкой положительной температуре позволила сохранить до 95% ЯСК (от их начального количества в соответствующих концентратах после выделения) как в кордовой, так и донорской крови (рис. 1).

После замораживания-отогрева лучшая сохранность ЯСК по отношению к начальному их количеству в соответствующих концентратах после выделения наблюдается в клеточных суспензиях, полученных двухэтапным центрифугированием (Conc3) и замороженных под защитой 10% ПЭО-1500, а также после выделения клеток с использованием полиглукина (Conc1) и замораживания с 5% ДМСО. Такие изменения сохранности наблюдали в суспензиях ЯСК как кордовой крови, так и донорской. После замораживания-отогрева ЯСК кордовой и донорской крови, выделенных с помощью фикола (Conc2), наблюдается снижение их сохранности: при использовании 5% ДМСО более чем на 30%, а с 10% ПЭО-1500 более чем на 37% (рис. 1).

Наибольшие потери ЯСК как донорской, так и кордовой крови наблюдаются в суспензиях клеток, выделенных с помощью полиглукина и замороженных без добавления ДМСО (Conc1). Так, сохранность ЯСК ДК составляет  $52,4 \pm 3,6$ , а КК –  $55,6 \pm 1,4\%$  от начального их количества в соответствующем концентрате ЯСК до замораживания (рис. 1).

На следующем этапе оценки состояния клеток в процессе криоконсервирования было проведено исследование жизнеспособности CD45<sup>+</sup>-клеток с использованием витального красителя 7AAD, который проникает в клетки с нарушениями целостности мембраны. Этот краситель образует в комплексе с ДНК высокофлуоресцентные аддукты, которые идентифицируют клетки как "нежизнеспособные" 7AAD<sup>+</sup>-клетки [10, 12]. При этом экспериментально было доказано, что использованные в работе высокомолекулярные непроникающие в клетку вещества (ПЭО-1500 и полиглукин) не блокируют CD-маркеры и не препятствуют проникновению ДНК-красителя 7AAD в клетки.



using 5% DMSO it fell more than by 30% and with 10% PEO-1500 it decreased more than by 37% (Fig. 1).

The highest losses of NCs of both adult donor and cord blood are observed in cell suspensions isolated with polyglukin and frozen without DMSO (Conc1). So, the survival rate of adult donor blood NCs makes  $52.4 \pm 3.6$  and  $55.6 \pm 1.4\%$  for cord blood cells if compare with their initial amount in corresponding concentrate of NCs prior to freezing (Fig. 1).

At the next stage of assessment of cell state during cryopreservation there was studied the viability of CD45<sup>+</sup> cells using vital dye 7AAD, penetrating into the cells with impaired membranes. This stain binds with DNA and forms highly fluorescent adducts, identifying cells as 'non-viable' 7AAD<sup>+</sup> cells [10, 12]. Herewith there was experimentally shown that the used in the research highly molecular substances non-penetrating into a cell (PEO-1500 and polyglukin) do not block CD markers and do not prevent the penetration of DNA-dye 7AAD into the cells.

It has been shown (Fig. 2) that after treatment with corresponding cryoprotectants of the cells isolated either with polyglyukin or two-step centrifugation the number of CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> cells both in adult donor and cord blood did not exceed 3%. In the case of the treatment with cryoprotectants of the cells isolated by ficoll the injuries were more evident: in cord blood cells the number of 7AAD<sup>+</sup> cells increased up to 7, and up to 12% in adult donor cells, that may be the result of their significant destabilization at the stage of isolation from a whole blood (Fig. 2).

The assessment of NC viability after freeze-thawing has shown (Fig. 2) that the lowest content of

**Рис. 2.** Количество жизнеспособных (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) клеток после обработки криопротекторами и замораживания-отогрева: □ – кордовая кровь; ■ – кровь взрослого донора; \* – статистически достоверные отличия между донорской и кордовой кровью ( $p \leq 0,05$ ).

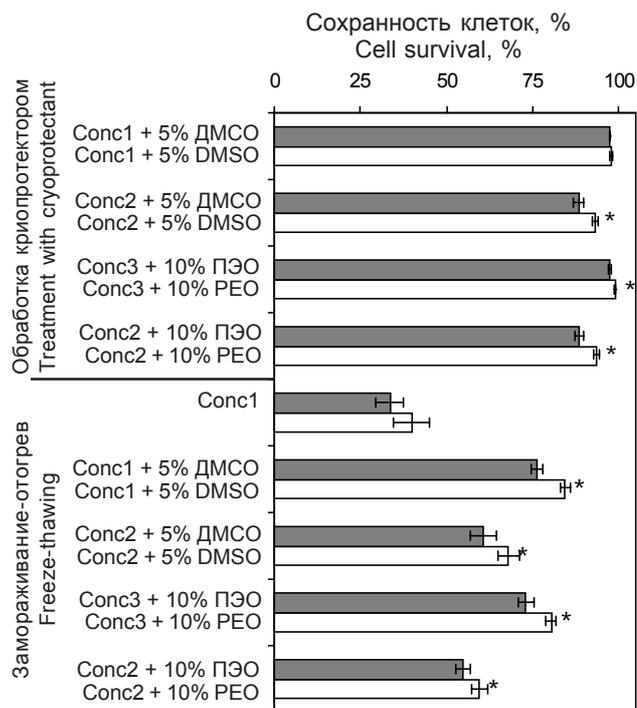
**Fig. 2.** Number of viable (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) cells after treatment with cryoprotectants and freeze-thawing: □ – cord blood; ■ – adult donor blood; \* – statistically significant differences between donor and cord blood ( $p \leq 0.05$ ).

Было показано (рис. 2), что после обработки соответствующими криопротекторами клеток, выделенных с помощью полиглюкина или двухэтапным центрифугированием, количество CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>-клеток как в донорской, так и кордовой крови не превышало 3%. Что касается обработки криопротекторами клеток, выделенных с помощью фиколла, то повреждения были уже более очевидны: в кордовой крови количество 7AAD<sup>-</sup>-клеток повышалось до 7, а в донорской – до 12%, что может быть результатом их существенной дестабилизации на этапе выделения из цельной крови (рис. 2).

Оценка жизнеспособности ЯСК после замораживания-отогрева показала (рис. 2), что самое низкое содержание 7AAD<sup>-</sup>-клеток как кордовой, так и донорской крови наблюдалось в суспензии ЯСК, выделенных с помощью полиглюкина и замороженных под защитой 5% ДМСО. Замораживание ЯСК под защитой 10% ПЭО-1500 после их выделения двухэтапным центрифугированием также характеризовалось низким содержанием 7AAD<sup>-</sup>-клеток.

Замораживание-отогрев ЯСК, выделенных с помощью полиглюкина (Conc1), без добавления дополнительного проникающего криопротектора, кроме наибольшей потери количества клеток, показывает самые низкие значения жизнеспособности (рис. 3). В данном случае нежизнеспособные клетки составляют  $66,4 \pm 4,0$  в донорской крови и  $60,0 \pm 5,3\%$  в кордовой (рис. 2).

Анализ жизнеспособности ЯСК, выделенных с помощью фиколла, показал высокое содержание 7AAD<sup>-</sup>-клеток после криоконсервирования. Так, замораживание-отогрев данных клеток с 5% ДМСО снижало жизнеспособность ядродержащих клеток КК на 31,9 и ДК на 39,4%, а под защитой 10% ПЭО-1500 – на 40,4 и 45,2% соответственно (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что значительная дестабилизация клеток при выделении с использованием фиколла приводит к криоконсервированию заведомо поврежденных клеток. Это проявляется в снижении их устойчивости и потере жизнеспособности на этапах добавления криопротектора и замораживания-отогрева.



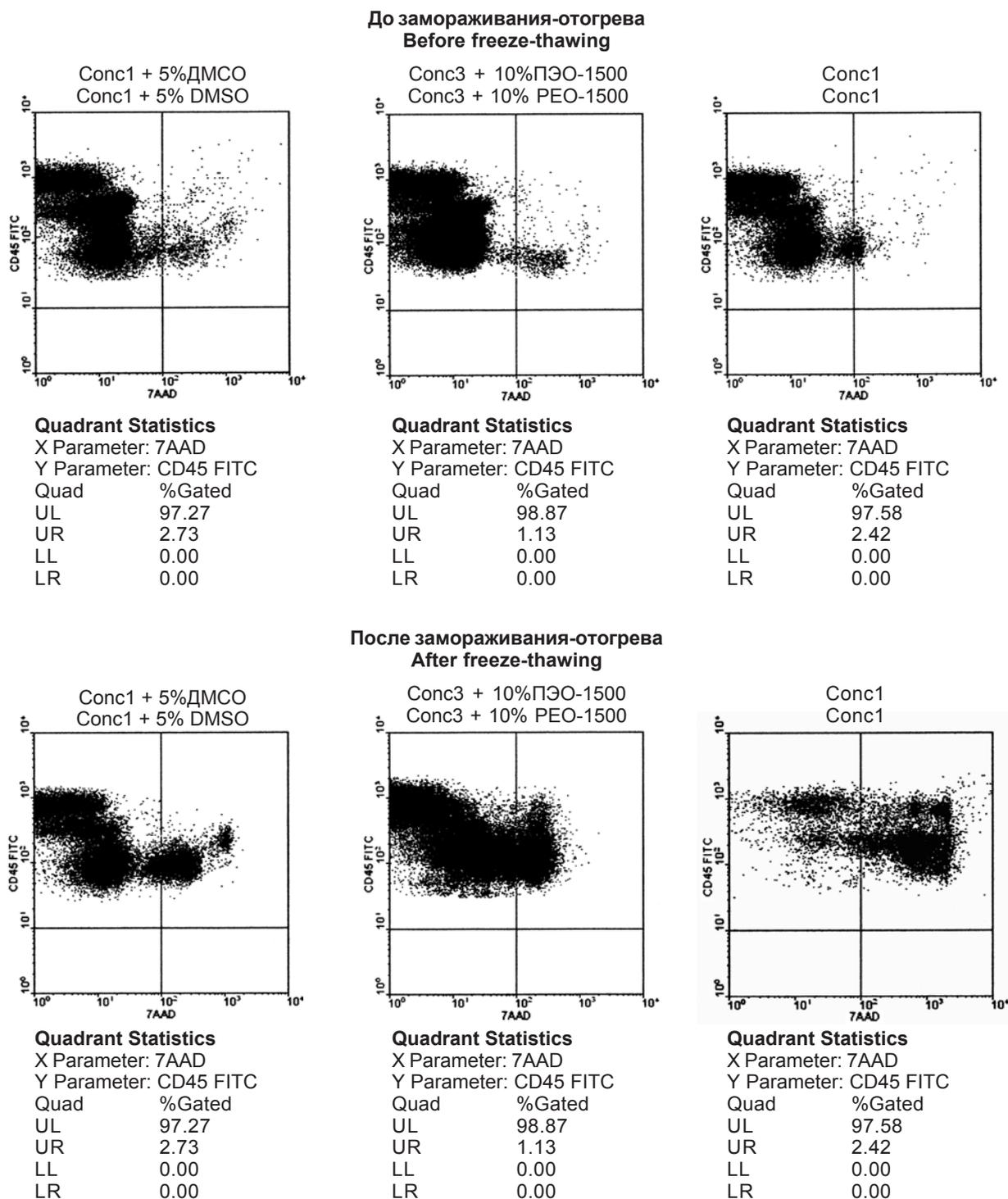
7AAD<sup>+</sup> cells of both cord and adult donor blood was observed in the suspension of the NCs isolated by means of polyglukin and frozen under 5% DMSO protection. Freezing of NCs under 10% PEO-1500 after their isolation with two-step centrifugation was also characterized with low content of 7AAD<sup>+</sup> cells.

Freeze-thawing of the NCs isolated with polyglukin (Conc1) without adding the penetrating cryoprotectant, resulted in the lowest values of viability and the biggest loss of the cell number (Fig. 3). In this case non-viable cells make  $66.4 \pm 4.0$  in adult donor blood and  $60.0 \pm 5.3\%$  in cord blood (Fig. 2).

Analysis of the viability of NCs, isolated with ficoll has shown a high content of 7AAD<sup>+</sup> cells after cryopreservation. So, freeze-thawing of these cells with 5% DMSO reduced the viability of nucleated cells of cord blood by 31.9 and adult donor cells by 39.4% and under the protection of 10% PEO-1500 by 40.4 and 45.2%, correspondingly (Fig. 2). These data show that significant destabilization of cells when isolating with ficoll results cryopreservation of already damaged cells. This manifests in their reduced resistance and loss of viability at the stages of adding cryoprotectant and freeze-thawing.

Since the fraction of blood CD45<sup>+</sup> cells is heterogeneous and comprises the populations of lymphocytes, monocytes and granulocytes there was important to estimate the state of each of these NC populations after the effect on them of damaging factors of cryopreservation.

The performed by us analysis of population composition of CD45<sup>+</sup> cells prior to and after cryopreservation



**Рис. 3.** Жизнеспособность ядродержащих клеток кордовой крови до и после замораживания-отогрева, %: UL – жизнеспособные (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) клетки; UR – нежизнеспособные (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) клетки. Данные типичного эксперимента.

**Fig. 3.** Viability of cord blood nucleated cells prior to and after freeze-thawing, %: UL – viable (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) cells, UR – non-viable (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) cells. The data of typical experiment.

Поскольку фракция CD45<sup>+</sup>-клеток крови является гетерогенной и включает популяции лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, важно оценить состояние каждой из данных популяций ЯСК после воздействия на них факторов криоконсервирования.

with different methods testify to a re-distribution of percentage ratio of NCs populations (Fig. 4, Table 1): the relative content of lymphocytes and monocytes increases, and granulocytes reduces, *i. e.* the cell losses during freezing occur mainly due to granulocytes.

Проведенный нами анализ популяционного состава CD45<sup>+</sup>-клеток до и после криоконсервирования различными методами свидетельствует о перераспределении процентного соотношения популяций ЯСК (рис. 4, табл.1): увеличивается относительное содержание лимфоцитов и моноцитов, а гранулоцитов снижается, т. е. потери клеток при замораживании происходят в основном за счет гранулоцитов.

Оценка сохранности и жизнеспособности различных популяций ЯСК, выделенных с помощью полиглюкина или двухэтапным центрифугированием, показала (табл.1, 2), что обработка клеток криопротекторами не приводила к значительному уменьшению количества и снижению жизнеспособности лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов.

Жизнеспособность лимфоцитов, выделенных с помощью полиглюкина и двухэтапным центрифугированием и замороженных под защитой соответствующих криопротекторов, оставалась на достаточно высоком уровне (табл. 2). Моноциты кордовой и донорской крови, подобно лимфоцитам, характеризовались высокой жизнеспособностью при использовании данных методов криоконсервирования. При этом основное снижение жизнеспособности ЯСК в этих препаратах, как и снижение сохранности, происходило за счет популяции гранулоцитов (табл. 2), которая менее устойчива к действию низких температур.

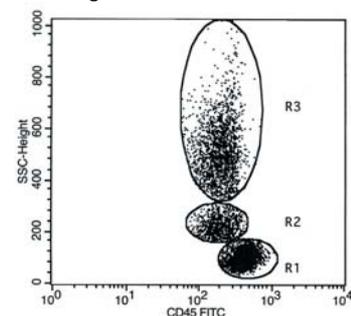
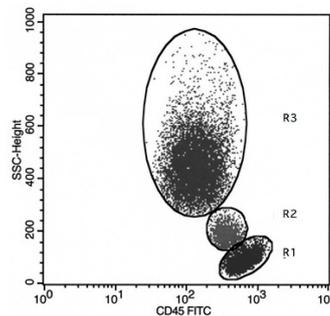
Обработка ЯСК, выделенных с помощью фикола (Conc2), приводила к более существенному снижению жизнеспособности лимфоцитов и моноцитов независимо от типа используемого криопротектора – проникающего (ДМСО) или непроникающего в клетки (ПЭО-1500). Гранулоциты характеризовались еще более высоким процентом нежизнеспособных клеток до 65 в ДК и 38% в КК.

Последующее замораживание-отогрев данных клеток (Conc2) приводило к увеличению количества нежизнеспособных лимфоцитов и моноцитов

Conc1 + 5% ДМСО  
Conc1 + 5% DMSO

Conc3 + 10% ПЭО-1500  
Conc3 + 10% PEO-1500

До замораживания-отогрева  
Before freeze-thawing



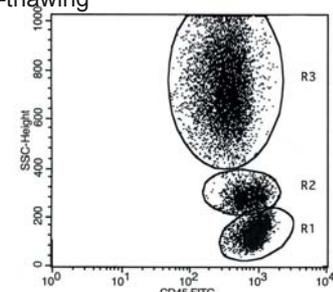
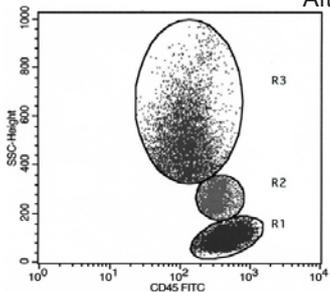
**Region Statistics**  
X Parameter: CD45 FITC  
Y Parameter: SSC-Height

**Region Statistics**  
X Parameter: CD45 FITC  
Y Parameter: SSC-Height

Quad	%Gated
R1	39.8
R2	13.3
R3	47.0

Quad	%Gated
R1	36.8
R2	13.1
R3	50.1

После замораживания-отогрева  
After freeze-thawing



**Region Statistics**  
X Parameter: CD45 FITC  
Y Parameter: SSC-Height

**Region Statistics**  
X Parameter: CD45 FITC  
Y Parameter: SSC-Height

Quad	%Gated
R1	42.9
R2	14.0
R3	43.1

Quad	%Gated
R1	41.2
R2	14.2
R3	44.5

**Рис.4.** Популяционный состав ядросодержащих (CD45<sup>+</sup>) клеток кордовой крови до и после криоконсервирования: R1 – лимфоциты; R2 – моноциты; R3 – гранулоциты. Данные типичного эксперимента.

**Fig. 4.** Populational composition of nucleated (CD45<sup>+</sup>) cells of cord blood prior to and after cryopreservation: R1 – lymphocytes; R2 – monocytes; R3 – granulocytes. The data of typical experiment.

Estimation of survival and viability of different populations of NCs, isolated with polyglukin or two-step centrifugation has shown (Table 1, 2) that treatment of the cells with cryoprotectants did not result in a significant lessening of the number and reduction of viability of lymphocytes, monocytes and granulocytes.

Viability of lymphocytes, isolated with polyglukin and two-step centrifugation and frozen-thawed under protection of corresponding cryoprotectants, remained

**Таблица 1.** Сохранность ядросодержащих клеток донорской и кордовой крови после обработки криопротектором и замораживания (по отношению к соответствующим концентратам), %

**Table 1.** Survival rate of nucleated cells of donor and cord blood after treatment with cryoprotectant and freezing (in respect to corresponding concentrates), %

Условия эксперимента Experimental conditions		Лимфоциты Lymphocytes		Моноциты Monocytes		Гранулоциты Granulocytes	
		ДК donor blood	КК cord blood	ДК donor blood	КК cord blood	ДК donor blood	КК cord blood
Обработка криопротектором Treatment with cryoprotectant	Conc1 + 5% ДМСО Conc1 + 5% DMSO	97,71 ± 0,9	97,80 ± 0,4	94,99 ± 2,5	94,93 ± 3,2	91,19 ± 1,2	91,01 ± 1,1
	Conc2 + 5% ДМСО Conc2 + 5% DMSO	95,58 ± 1,0	94,04 ± 0,8	95,29 ± 1,7	91,14 ± 2,0	65,99 ± 8,4	82,43 ± 2,7
	Conc3 + 10% ПЭО Conc3 + 10% PEO	98,37 ± 0,4	98,98 ± 0,4	93,39 ± 3,6	98,31 ± 0,4	94,12 ± 0,5	92,77 ± 1,0
	Conc2 + 10% ПЭО Conc2 + 10% PEO	94,39 ± 1,1	96,98 ± 1,1	93,62 ± 2,3	94,35 ± 1,7	65,82 ± 10,2	67,42 ± 5,6
Замораживание- отогрев Freeze-thawing	Conc1 + 5% ДМСО Conc1 + 5% DMSO	94,14 ± 2,4	96,65 ± 1,3	83,75 ± 7,4	94,19 ± 4,9	51,65 ± 3,9	67,39 ± 1,4
	Conc2 + 5% ДМСО Conc2 + 5% DMSO	66,58 ± 3,8	74,00 ± 5,9	77,78 ± 2,6	72,72 ± 4,8	41,05 ± 11,7	24,18 ± 5,1
	Conc3 + 10% ПЭО Conc3 + 10% PEO	97,19 ± 0,9	97,76 ± 1,6	93,17 ± 2,4	95,74 ± 1,6	63,30 ± 2,8	73,69 ± 1,9
	Conc2 + 10% ПЭО Conc2 + 10% PEO	57,45 ± 4,8	66,56 ± 5,2	22,69 ± 4,5	36,32 ± 11,5	24,58 ± 8,2	35,75 ± 12,3
	Conc1	76,58 ± 5,9	74,26 ± 1,8	68,01 ± 9,2	63,00 ± 6,5	31,52 ± 4,2	42,69 ± 2,9

**Таблица 2.** Количество жизнеспособных (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) клеток донорской и кордовой крови после обработки криопротектором и замораживания, %

**Table 2.** Number of viable (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) cells of donor's and cord blood after treatment with cryoprotectants and freezing, %

Условия эксперимента Experimental conditions		Лимфоциты Lymphocytes		Моноциты Monocytes		Гранулоциты Granulocytes	
		ДК donor blood	КК cord blood	ДК donor blood	КК cord blood	ДК donor blood	КК cord blood
Обработка криопротектором Treatment with cryoprotectant	Conc1 + 5% ДМСО Conc1 + 5% DMSO	97,48 ± 0,5	99,43 ± 0,2	94,18 ± 0,7	98,4 ± 0,3	98,03 ± 0,5	96,41 ± 1,0
	Conc2 + 5% ДМСО Conc2 + 5% DMSO	92,64 ± 1,4	95,04 ± 0,4	87,6 ± 0,8	93,07 ± 0,7	56,92 ± 13,4	74,92 ± 10,9
	Conc3 + 10% ПЭО Conc3 + 10% PEO	98,2 ± 0,3	99,34 ± 0,1	95,88 ± 0,3	98,88 ± 0,2	96,96 ± 1,2	98,62 ± 0,2
	Conc2 + 10% ПЭО Conc2 + 10% PEO	94,46 ± 0,8	95,69 ± 0,4	87,38 ± 0,7	94,01 ± 0,7	50,19 ± 14,8	71,39 ± 9,1
Замораживание- отогрев Freeze-thawing	Conc1 + 5% ДМСО Conc1 + 5% DMSO	88,18 ± 0,8	96,77 ± 0,5	83,66 ± 1,5	96,14 ± 0,9	55,66 ± 5,3	63,26 ± 6,1
	Conc2 + 5% ДМСО Conc2 + 5% DMSO	65,72 ± 3,4	73,75 ± 2,9	56,82 ± 3,1	55,99 ± 4,1	15,17 ± 4,4	13,23 ± 3,1
	Conc3 + 10% ПЭО Conc3 + 10% PEO	84,56 ± 0,6	95,82 ± 0,4	81,4 ± 0,4	90,31 ± 0,7	44,70 ± 8,4	56,00 ± 4,2
	Conc2 + 10% ПЭО Conc2 + 10% PEO	60,22 ± 1,8	65,15 ± 2,1	48,68 ± 2,1	47,59 ± 2,8	21,65 ± 11,5	20,14 ± 9,6
	Conc1	42,18 ± 2,1	53,56 ± 4,2	33,7 ± 4,1	58,51 ± 9,3	15,71 ± 11,0	22,13 ± 11,8

(табл. 2). Что касается популяции гранулоцитов, которая составляет не более 10% от всех ЯСК после выделения с использованием фикола, то их жизнеспособность как в ДК, так и КК после замораживания-отогрева снижалась до 90% независимо от типа используемого криопротектора (табл. 2).

Как видно из табл. 1 и 2, замораживание-отогрев ЯСК, выделенных с помощью полиглукина, без добавления ДМСО приводит к гибели большего количества лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов как КК, так и ДК. Такое снижение жизнеспособности клеток (см. рис. 2) на фоне потери их количества (см. рис. 1) может привести к неэффективности данного препарата при использовании в клинической практике.

Также необходимо отметить, что практически во всех случаях после обработки ЯСК криопротектором и замораживания-отогрева жизнеспособность лимфоцитов и моноцитов КК была существенно выше таковой в ДК, что свидетельствует о большей устойчивости мононуклеаров КК к повреждающим факторам криоконсервирования.

## Выводы

Проведенные исследования показали, что выделение ядросодержащих клеток с использованием полиглукина и последующее их замораживание под защитой 5% ДМСО, а также выделение ЯСК методом двухэтапного центрифугирования с последующим замораживанием под защитой 10% ПЭО-1500 позволяют максимально сохранить количество ЯСК в препаратах, полученных как из кордовой крови, так и донорской. При этом их жизнеспособность остается на достаточно высоком уровне. Основное уменьшение сохранности и снижение жизнеспособности ЯСК независимо от используемого метода криоконсервирования происходят за счет популяции гранулоцитов, а лимфоциты и моноциты являются более устойчивыми к повреждающим факторам криоконсервирования. Также было показано, что мононуклеарные клетки кордовой крови более устойчивы к повреждающим факторам криоконсервирования, чем более зрелые клетки донорской крови, что проявляется в существенных отличиях показателей жизнеспособности клеток практически во всех случаях до и после их криоконсервирования.

## Литература

1. Бабийчук Л. А., Грищенко В. И., Рязанцев В. В. и др. Новые подходы к проблеме криоконсервирования гемопоэтических клеток кордовой крови человека // Укр. журнал гематол. і трансфузіол.– 2005.– № 4(д).– С.122–123.

at quite a high level. Monocytes of cord and adult donor blood, like lymphocytes, were characterized with a high viability when using these methods of cryopreservation. Herewith the main reduction of NC viability in these preparations as well as a decrease in survival rate, occurred due to the population of granulocytes, which was less resistant to the effect of low temperatures.

Treatment of the NCs isolated with ficoll (Conc2) led to more significant reduction of viability of lymphocytes and monocytes independently on the type of the used cryoprotectants – penetrating (DMSO) or non-penetrating into cells (PEO-1500). Granulocytes were characterized with even higher percent of non-viable cells: in adult donor blood up to 65 and 38% in cord blood.

Further freeze-thawing of these cells (Conc2) resulted in the rise of the number of non-viable lymphocytes and monocytes (Table 2). As for the population of granulocytes, comprising no more than 10% of all NCs after isolation using ficoll then their post-thaw viability both in adult donor and cord blood reduced down to 90% undependently on the type of the used cryoprotectants (Table 2).

As Tables 1 and 2 show the freeze-thawing of NCs, isolated with polyglukin with no DMSO results in the death of bigger amount of lymphocytes, monocytes and granulocytes both in cord and adult donor blood. Such a reduction of viable cells (see Fig. 2) on the background of the loss of their amount (see Fig. 1) may lead to inefficiency of this preparation when used in clinical practice.

It also should be noted that virtually in all the cases after treatment of NCs with cryoprotectants and freeze-thawing the viability of lymphocytes and monocytes of cord blood was considerably higher than that in adult donor blood, testifying to a higher resistance of cord blood mononuclear cells to cryopreservation damaging factors.

## Conclusions

The performed studies have shown that isolation of nucleated cells using polyglukin and their following freezing under 5% DMSO protection as well as isolation of NCs by two-step centrifugation with following freezing under 10% PEO-1500 protection enables the maximum preservation of NCs number in the preparations obtained both from cord blood and adult donor blood. Herewith their viability has remained at quite a high level. Basic reduction in the survival rate and decrease in viability of NCs independently in the used method of cryopreservation occur due to the population of granulocytes, unlike lymphocytes and monocytes which are more resistant to cryopreservation damaging factors. Also it has been demonstrated that mononuclear cells of cord blood are more resistant to cryopreservation damaging factors if compared with mature cells of adult donor blood, which is manifested in significant

2. Михайлова О.А., Бабійчук Л. А., Рязанцев В. В., Зубов П.М. Оценка жизнеспособности и степени нарушения асимметрии мембран ядродержащих клеток при различных методах их выделения из цельной кордовой и донорской крови // Вісник проблем біології і медицини.– 2011.– Вип.4(90).– С.118–122.
3. Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., Зайцева О.О. и др. Разработка нового метода сохранения жизнеспособных лейкоцитов в условиях околонулевых температур // Казанский мед. журнал.– 2008.– №4.– С.558–560.
4. Пат. 23499 Україна, МПК С 12 N 5/00. Спосіб виділення ядромісних клітин кордової крові / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, В.В. Рязанцев, П. М. Зубов, О. Л. Зубова; Заявлено 22.01.07; опубл. 25.05.07, Бюл. №7.
5. Пат. 92227 Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб криоконсервування ядромісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гурина та ін.; Заявлено 05.12.2008; опубл. 11.10.2010, Бюл.№19.
6. Abrahamsen J.F., Bakken A.M., Bruserud O. et al. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases // Bone Marrow Transplant.– 2002.– Vol.29, N2.– P.165–171.
7. Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.– 1968.– Vol. 97.– P. 31–50.
8. 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.
9. Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling // N. Engl. J. Med.– 1989.– Vol. 321, N17.– P. 1174–1178.
10. Halle P., Tournilhac O., Knopinska-Posluszny W. et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at –80 degrees C, with only 3.5–percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations // Transfusion.– 2001.– Vol. 41, N5.– P. 667–673.
11. Hubl W., Iturraspe J., Hutcheson C.E. et al. Effect of storage on stem cell concentration and viability in cord blood // Blood.– 1997.– Vol. 90, N10.– P. 326b.
12. Philpott N.J., Turner A.J., Scopes J. et al. The use of 7-aminoactinomycin D identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques // Blood.– 1996.– Vol. 87, N6.– P. 2244–2251.
13. Siena S., Bregni M., Brando B. et al. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // Blood.– 1989.– Vol. 74, N6.– P. 1905–1914.
14. Watt S.M., Contreras M. Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential // Semin. Fetal Neonatal Med.– 2005.– Vol. 10, N3.– P.209–220.

Поступила 08.11.2011  
Рецензент А.М. Компаниец

differences of the indices of cell viability virtually in all the cases prior to and after cryopreservation.

## References

1. Babiychuk L.A., Grischenko V.I., Ryazantsev V.V. et al. New approaches to problems of cryopreservation of hemopoietic cells of human cord blood// Ukr. Zhurnal Gematol. i Tranzfuziol.– 2005.– N4(d).– P. 122–123.
2. Mikhaylova O.A., Babiychuk L.A., Ryazantsev V.V., Zubov P.M. Assessment of viability and rate of asymmetry disorder in membranes of nucleated cells during different methods of their isolation from whole cord and donor blood // Visnyk Problem Biologii i Meditsyny.– 2011.– Issue 4(90).– P. 118–122.
3. Svedentsov Ye.P., Tumanova T.V., Zaytseva O.O. et al. Development of new method of preservation of viable leukocytes under conditions of about zero temperatures// Kazansky Med. Zhurnal.– 2008.– N4.– P. 558–560.
4. Patent 23499 Ukraine, IPC12N5/00. Method of isolation of cord blood nucleated cells / L.O. Babiychuk, V.I. Grischenko, V.V. Ryazantsev, P.M. Zubov, O.L. Zubova; Applied 22.01.07; Publ. 25.05.07, Bul. N7.
5. Patent 92227 Ukraine, IPC A01N1/02. Method of cryopreservation of nucleated cells of cord blood, including hemopoietic stem cells/ L.O. Babiychuk, V.I. Grischenko, T.M. Gurina et al. Applied 05.12.2008; Publ. 11.10.2010, Bul. N19.
6. Abrahamsen J.F., Bakken A.M., Bruserud O. et al. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases // Bone Marrow Transplant.– 2002.– Vol.29, N2.– P.165–171.
7. Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.– 1968.– Vol. 97.– P. 31–50.
8. 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.
9. Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling // N. Engl. J. Med.– 1989.– Vol. 321, N17.– P. 1174–1178.
10. Halle P., Tournilhac O., Knopinska-Posluszny W. et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at –80 degrees C, with only 3.5–percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations // Transfusion.– 2001.– Vol. 41, N5.– P. 667–673.
11. Hubl W., Iturraspe J., Hutcheson C.E. et al. Effect of storage on stem cell concentration and viability in cord blood // Blood.– 1997.– Vol. 90, N10.– P. 326b.
12. Philpott N.J., Turner A.J., Scopes J. et al. The use of 7-aminoactinomycin D identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques // Blood.– 1996.– Vol. 87, N6.– P. 2244–2251.
13. Siena S., Bregni M., Brando B. et al. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // Blood.– 1989.– Vol. 74, N6.– P. 1905–1914.
14. Watt S.M., Contreras M. Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential // Semin. Fetal Neonatal Med.– 2005.– Vol. 10, N3.– P.209–220.

Accepted 08.11.2011