УДК 615.361.018.5.013.8.014.41

Е.В. Бровко*, С.С. Черноусова

Функциональные характеристики криоконсервированных клеток кордовой крови человека в зависимости от условий предварительного гипотермического хранения

UDC 615.361.018.5.013.8.014.41

E.V. Brovko*, S.S. Chernousova

Functional Characteristics of Cryopreserved Human Cord Blood Cells Depending on Preliminary Hypothermic Storage Conditions

В настоящее время в медицине широко применяется кордовая кровь человека (ККЧ), которая вследствие простоты и дешевизны заготовки является альтернативным костному мозгу и крови взрослого донора источником получения необходимых компонентов (стволовых кроветворных клеток, ядросодержащих клеток, плазмы и т.д.). На базе ИПК и К НАН Украины разработан метод получения и криоконсервирования препарата «Гемокорд» без применения традиционных криопротекторов, в его состав входят ядросодержащие клетки ККЧ, взвешенные в аутологичной плазме [4]. Технологический процесс криоконсервирования нативного препарата обеспечивает максимальное сохранение криоустойчивости его компонентов. Нативный препарат сразу же после приготовления может не подвергаться криоконсервированию.

Цель работы – изучение функциональных характеристик криоконсервированных ядросодержащих клеток препарата в зависимости от условий его предварительного гипотермического хранения.

Материалы и методы

Объектом исследования служили образцы препарата «Гемокорд», которые хранились 24 и 48 ч в пластиковых контейнерах в холодильнике при температуре 2–4°С. Контролем суспензий после хранения в условиях гипотермии 24 и 48 ч были нативные суспензии препарата, контролем образцов, хранившихся 48 ч, – нативные суспензии и суспензии после 24 ч хранения. На каждом этапе гипотермического хранения образцы препарата криоконсервировали по двухэтапной программе без традиционных криопротекторов [5] и хранили при температуре –196°С. Материал отогревали на водяной бане при температуре 40–41°С.

Для контроля образцов препарата, криоконсервированных сразу после приготовления, использовали нативные суспензии. Показатели препарата,

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

The human cord blood (HCB), being now widely applied in medicine, due to its simplicity and low price for procurement is an alternative source to bone marrow and blood of adult donor in obtaining the necessary components (hemopoietic stem cells, nucleated cells, plasm etc.). The method for the "Hemocord" preparation procurement and cryopreservation with no traditional cryoprotectant use, comprising nucleated HCB cells, suspended in autologous plasm, has been designed at the base of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [4]. Technological process of cryopreservation for a native preparation provides the maximum cryoresistance for its components. The native preparation may not be subjected to cryopreservation right after preparing.

This research was aimed to study the functional characteristics of cryopreserved nucleated cells of the preparation depending on its preliminary hypothermic storage conditions.

Materials and methods

Samples of "Hemocord" preparations stored for 24 and 48 hrs in plastic containers in refrigerator at 2–4°C served as the investigation object. The control for suspensions after storing under hypothermia for 24 and 48 hrs were the native suspensions of preparation, the control for samples, stored for 48 hrs were the native suspensions and those after 24 hrs storage. At each step of hypothermic storage the preparation samples were cryopreserved according to the two-step program with no traditional cryoprotectants [5] and stored at –196°C. The material was thawed on water bath at 40–41°C.

For the control of preparation samples, cryopreserved just after preparing, we used the native suspensions. The indices of the preparation, cryopreserved after 24 hrs' hypothermic storage were compared with those of the suspensions as follows: native; stored for

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

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

криоконсервированного после 24 ч гипотермического хранения, сравнивали с показателями суспензий: нативных; хранившихся 24 ч при 4°С криоконсервированных сразу после приготовления препарата. Контролем для образцов препарата, криоконсервированных после 48 ч гипотермического хранения, были суспензии: нативные; после предварительного гипотермического хранения 24 и 48 ч; криоконсервированные после приготовления и после гипотермического хранения 24 ч.

В образцах определяли количество ядросодержащих клеток и относительное количество сохранных клеток [2]. Фагоцитарную активность ядросодержащих клеток исследовали через 1 ч инкубации клеток с 18-часовой культурой *S. aureus*, убитой нагреванием [1]. В окрашенных азур II-эозином мазках среди 200 ядросодержащих клеток определяли фагоцитарный индекс (относительное количество клеток, находящихся на стадии поглощения микроорганизмов) и фагоцитарное число. Готовность фагоцитирующих клеток к завершенному фагоцитозу определяли с помощью индуцированного теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Об активности метаболических процессов, обеспечивающих внутриклеточную выработку перекиси водорода, судили по количеству гранул внутриклеточного диформазана [3].

Результаты и обсуждение

Установлено, что гипотермическое хранение образцов нативного препарата «Гемокорд» в течение 48 ч и последующее его криоконсервирование достоверно не влияли на количество ядросодержащих клеток в суспензии по отношению к их содержанию в нативных образцах (таблица).

На этапах гипотермического хранения нативных образцов препарата «Гемокорд» относительное количество сохранных клеток не изменялось, однако после криоконсервирования препарата после 24 ч его предварительного хранения данный показатель достоверно снижался. При криоконсервировании препарата после его предварительного гипотермического хранения в течение 48 ч относительное количество сохранных клеток было достоверно ниже данного показателя для препарата, криоконсервированного после 24 ч гипотермического хранения (таблица).

При изучении функциональной активности ядросодержащих клеток показано, что более 50% клеток нативной суспензии обладали способностью к фагоцитозу. Фагоцитарный индекс в нативных образцах достоверно снижался после гипотермического хранения в течение 48 ч. После отогрева криоконсервированных образцов, хранившихся в условиях гипотермии в течение 24 и 48 ч, отмечено достоверное снижение фагоцитарного индекса (таблица).

24 hrs at 4°C; cryopreserved just after preparation preparing. The control for the preparation samples, cryopreserved after 48 hrs' hypothermic storage were the following suspensions: native; after 24 and 48 hrs' preliminary hypothermic storage; cryopreserved just after preparing and after 24 hrs' hypothermic storage.

The amount of nucleated cells and a relative number of preserved cells were determined in the samples [2]. Phagocyte activity of nucleated cells was studied 1 hr later cell incubation with 18 hrs heat-killed *S. aureus* culture [1]. In the azur II-eosin-stained smears among 200 nucleated cells we determined a phagocyte index (a relative number of cells at the stage of microorganism scavenging) and a phagocyte number. The promptitude of phagocytising cells to a completed phagocytosis was determined with an induced test of nitroblue tetrasolium recovery (NBT-test). The activity of metabolic processes, providing an intracellular production of peroxide was judged by the number of intracellular diformazan granules [3].

Results and discussion

Hypothermic storage of samples of "Hemocord" native preparation for 48 hrs and its following cryopreservation were established as not affecting the amount of nucleated cells in suspension in respect of their content in native samples (Table).

At the stage of hypothermic storage of native samples of "Hemocord" preparation a relative number of preserved cells remained unchanged, but after the preparation cryopreservation following 24 hrs' preliminary storage this index was statistically and significantly reduced. Under preparation cryopreservation after its preliminary 48 hrs' hypothermic storage a relative number of preserved cells was statistically and significantly lower than this index for the preparation, cryopreserved after 24 hrs' hypothermic storage (Table).

When studying a functional activity of nucleated cells more than 50% of cells of native suspension were shown as capable for phagocytosis. Phagocyte index in native samples statistically and significantly decreased after 48 hrs' hypothermic storage. After thawing of the cryopreserved samples, stored under hypothermia for 24–48 hrs a statistically significant reduction of phagocyte index was noted (Table).

Phagocyte number statistically and significantly reduced even after 24 hrs' hypothermic storage of native suspensions of the preparation. When cryopreserving both native and stored for 24 and 48 hrs preparations at 4°C, there was a statistically significant decrease in phagocyte number compared to this index for native and cryopreserved suspensions (Table).

A relative number of NBT-positive cells was statistically and significantly reduced both in frozen-thawed native suspensions and after their 24 and 48 hrs' preliminary hypothermic storage (Table).

Количество сохранных, ядросодержащих клеток и показатели их функциональной активности в образцах препарата «Гемокорд» на этапах гипотермического хранения до криоконсервирования и после отогрева криоконсервированных суспензий

The number of preserved nucleated cells and indices of their functional activity in samples of "Hemocord" preparation at the stages of hypothermic storage prior to cryopreservation and after cryopreserved suspension thawing

Время хранения образцов при 4°С до криоконсервирования, ч Samples' storage time at 4°C down to cryopreservation, hr		Относительное количество сохранных клеток, % Relative number of preserved cells, %	Количество ядросодержащих клеток, $\times 10^7$/мл Number of nucleated cells, $\times 10^7$/ml	Фагоцитарный индекс Phagocyte index	Фагоцитарное число Phagocyte number	Относительное количество НСТ–положительных клеток, % Relative number of NBT–positive cells, %
0	H_0 N_0	99,17±0,17	1,71±0,07	52,33±1,82	3,57±0,18	80,83±3,3
	K_0 C_0	96,17±1,08	1,72±0,07	51,5±2,42	2,96±0,30[1]	53,33±1,71[1]
24	H_{24} N_{24}	97,17±0,87	1,73±0,08	52,5±2,57	3,13±0,15[1]	79,5±1,54
	K_{24} C_{24}	53,5±1,88[1,2,4]	1,66±0,08	42,83±4,08[1,2,4]	2,77±0,20[1,2]	44,0±1,46[1,2,4]
48	H_{48} N_{48}	96,83±0,6	1,67±0,12	40,33±1,43[1,2]	1,66±0,08[1,2]	81,17±0,6
	K_{48} C_{48}	44,17±2,09[1,2,3,4,5]	1,62±0,09	19,17±1,49[1,2,3,4,5]	1,27±0,12[1,2,3,4,5]	31,0±2,81[1,2,3,4,5]

Примечания: Н – нативный образец; К – криоконсервированный нативный образец; [1] – достоверные различия ($p<0,05$) по сравнению с H_0; [2] – достоверные различия ($p<0,05$) по сравнению с H_{24}; [3] – достоверные различия ($p<0,05$) по сравнению с H_{48}; [4] – достоверные различия ($p<0,05$) по сравнению с K_0; [5] – достоверные различия ($p<0,05$) по сравнению с K_{24}.

Notes: N is a native sample; C is a cryopreserved native sample; [1] – statistically significant differences ($p<0.05$) compared to H_0; [2] – statistically significant differences ($p<0.05$) compared to H_{24}; [3] – statistically significant differences ($p<0.05$) compared to H_{48}; [4] – statistically significant differences ($p<0.05$) compared to C_0; [5] – statistically significant differences ($p<0.05$) compared to C_{24}.

Фагоцитарное число достоверно уменьшалось уже после 24 ч гипотермического хранения нативных суспензий препарата. При криоконсервировании нативного препарата, как и препарата, хранившегося 24 и 48 ч при 4°С, достоверно уменьшалось фагоцитарное число по сравнению с данным показателем нативных и криоконсервированных суспензий (таблица).

Относительное количество НСТ-положительных клеток достоверно уменьшалось как в деконсервированных нативных суспензиях, так и после 24 и 48 ч их предварительного гипотермического хранения (таблица).

Показано, что количество ядросодержащих клеток препарата не изменялось при гипотермическом хранении и после криоконсервирования. Относительное количество сохранных клеток уменьшалось при криоконсервировании препарата после 24 ч гипотермии. Показатели фагоцитарной активности ядросодержащих клеток проявляли разную чувствительность к факторам гипотермического хранения и криоконсервирования. Фагоцитарный индекс уменьшился после 48 ч гипотермического хранения, а фагоцитарное число уменьшилось к 24 ч гипотермического хранения нативного препарата; относительное количество НСТ-положительных клеток препарата «Гемокорд» не изменялось на этапах гипотермического хранения и достоверно

Number of the preparation's nucleated cells was shown as unchanged under hypothermic storage and after cryopreservation. A relative number of preserved cells reduced under preparation cryopreservation after 24-hrs' hypothermia. The indices of nucleated cells' phagocyte activity manifested a different sensitivity to both factors of hypothermic storage and cryopreservation. Phagocyte index decreased after 48-hrs' hypothermic storage but phagocyte number reduced to the 24 hrs of hypothermic storage of native preparation; a relative number of NBT-positive cells of "Hemocord" preparation was unchanged at the stages of hypothermic storage and was statistically and significantly decreased after cryopreservation of preparation's native samples.

Conclusions

The data presented confirm the fact, that a hypothermic storage of "Hemocord" preparation provides a cryolability of its components. Basing on the used methodical approaches there is possible to determine the "optimal" terms for hypothermic storage of "Hemocord" preparation prior to cryopreservation.

References

1. *Lebedev K.A., Ponyakina I.D.* Immunogram in clinical practice.– Moscow: Nauka, 1990.– 224 p.

снижалось после криоконсервирования нативных образцов препарата.

Выводы

Представленные данные подтверждают, что гипотермическое хранение препарата «Гемокорд» обеспечивает криолабильность его компонентов. На основе использованных методических подходов возможно определение «оптимальных» сроков гипотермического хранения препарата «Гемокорд» до криоконсервирования.

Литература

1. *Лебедев К.А., Понякина И.Д.* Иммунограмма в клинической практике.– М.: Наука, 1990.– 224 с.
2. *Лабораторные методы исследования в клинике:* Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др.– М.: Медицина, 1987.– 368 с.
3. *Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т.* Гистохимия ферментов.– М.: Мир, 1982.– 270 с.
4. *Цуцаєва А.О., Грищенко В.І. та інш.* Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування гемопоетичних клітин кордової крові людини: Метод. рекомендації.– Харків, 2000.– 17 с.
5. *Патент №31847А (Україна) МПК А01№1/02.* Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаєва, В.І. Грищенко, О.В. Кудокоцева та інш. Заявлено 05.11.1998 р.; Опубл. 15.12.2000р., Бюл. №7.– С. 1.10.

Поступила 20.05.2008

2. *Laboratory research methods in clinic:* Reference book / V.V. Menshikov, L.N. Delektorskaya, R.P. Zolotnitskaya et al.– Moscow: Meditsina, 1987.– 368 p.
3. *Loyda Z., Gossrau R., Shibler T.* Histochemistry of enzymes.– Moscow: Mir, 1982.– 270 p.
4. *Tsutsayeva A.O., Grischenko V.I. et al.* Procurement, cryopreservation and clinical application of human cord blood hemopoietic cells: Methodical recommendations.– Kharkov.– 2000.– 17 p.
5. *Patent N 31847A (Ukraine) IPC A01N1/02.* Method for cord blood hemopoietic cell cryopreservation / A.O. Tsutsayeva, V.I. Grischenko, O.V. Kudokotseva et al. Applied 05.11.1998; Published 15.12.2000, Bull. N7.– P.1.10.

Accepted in 20.05.2008