

Криоконсервирование кордовой крови: оценка структурно-функционального состояния ядродержащих клеток

Л.А. БАБИЙЧУК, П.М. ЗУБОВ, В.В. РЯЗАНЦЕВ, О.Л. ЗУБОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Cord Blood: Evaluation of Structure-Functional State of Nucleated Cells

L.A. BABYCHUK, P.M. ZUBOV, V.V. RYAZANTSEV, O.L. ZUBOVA

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

Разработка новых технологий криоконсервирования и создания банков, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии при температуре жидкого азота, обусловлена высокой востребованностью в препаратах кордовой крови (КК), содержащих гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Эффективность применения препаратов КК в клинике определяется не только достаточным количеством клеток, но и их качеством, т. е. сохранением структурно-функциональной полноценности клеток после размораживания. Цель данной работы – разработка новых технологий криоконсервирования ядродержащих клеток КК и комплексная оценка структурно-функциональной полноценности клеток на каждом этапе криоконсервирования.

Определение фенотипа клеток, их жизнеспособности ($CD45^+7AAD^-$, $CD34^+7AAD^-$), а также нарушения асимметрии мембран проводились с использованием метода проточной цитофлуориметрии. Колониеобразующую активность оценивали в метилцеллюлозной среде «MethoCult» («StemCellTechnologies»).

Анализ сохранности ЯСК, выделенных с применением декстрана Д-60, показал, что данный метод позволяет выделять до 80% $CD45^+$ - и до 90% $CD34^+$ - клеток из КК и не приводит к снижению их жизнеспособности. Разработанный метод криоконсервирования ЯСК КК позволяет снизить концентрацию ДМСО до 5% и получить после размораживания высокий процент жизнеспособных клеток (до 85% $CD45^+7AAD^-$ - и до 95% $CD34^+7AAD^-$ -клеток). При этом снижение сохранности и жизнеспособности $CD45^+$ -клеток происходит в основном за счет гранулоцитов, жизнеспособность которых составляет $69,8 \pm 3,7\%$, а мононуклеаров (лимфоциты и моноциты) – 94–98%.

Оценка нарушений липидной асимметрии мембран с использованием аннексина V свидетельствует, что выделение и обработка ДМСО достоверно не изменяют данный показатель, а после размораживания клеток нарушение асимметрии составляет $6,34 \pm 1,02\%$. Анализ липидной асимметрии в популяциях ЯСК показал, что после криоконсервирования минимальные изменения наблюдаются у мононуклеаров (до 3%), максимальные – у гранулоцитов (16%), что коррелирует с полученными нами данными по жизнеспособности клеток.

Проведенные исследования колониеобразующей активности показали, что клетки образовывали колонии, имеющие эритроидную, гранулоцитарную, макрофагальную и смешанную морфологию, что характерно для стволовых клеток гемопоэтического ряда. Общее количество колоний до и после криоконсервирования изменялось незначительно и составляло $228,6 \pm 31,4$ и $247,6 \pm 36,8$ соответственно.

The development of new cryopreservation technologies and establishment of banks wherein the samples are stored in frozen state at the temperature of liquid nitrogen is stipulated by a high demand in cord blood (CB) preparations containing hematopoietic stem cells (HSCs). Efficiency of CB preparations use in clinics is determined by a sufficient number of cells as well as their quality, *i. e.* preservation of their structure-functional viability after thawing. The research aim was to develop new cryopreservation technologies for CB nucleated cells and complex evaluation of cell structure-functional integrity at each cryopreservation stage.

Determination of cell phenotype, their viability ($CD45^+7AAD^-$, $CD34^+7AAD^-$) and disorders of membrane asymmetry were performed by flow cytofluorimetry. Colony-forming activity was assessed in methyl cellulose medium MethoCult (StemCellTechnologies).

Analysis of survival of nucleated cells isolated with dextran D-60 showed that this method allowed isolating up to 80% of $CD45^+$ and up to 90% of $CD34^+$ cells from CB and not inducing the decrease of their viability. The developed method of CB NCs cryopreservation enables decreasing DMSO concentration down to 5% and obtaining after thawing a high percent of viable cells (up to 85% of $CD45^+7AAD^-$ and up to 95% of $CD34^+7AAD^-$ cells). Moreover decrease of survival and integrity of $CD45^+$ cells occurs mainly due to granulocytes, the viability of which is $69.8 \pm 3.7\%$ and one of mononuclears (lymphocytes and monocytes) makes 94–98%.

Evaluation of disorders in membrane lipid asymmetry using AnnexinV showed that the process of cell isolation and treatment with DMSO do not significantly change this index and after thawing the amount of cells with distorted asymmetry is $6.34 \pm 1.02\%$. Analysis of lipid asymmetry in NCs populations has shown that after cryopreservation minimal changes were observed in mononuclears (up to 3% of cells), maximal ones were in granulocytes (16%) correlating with obtained data for cell viability.

The performed investigations of colony-forming activity have shown that the cells formed colonies with erythroid, granulocytic, macrophagal and mixed morphology characteristic for stem cells of hematopoietic range. Total number of colonies prior to and after cryopreservation changed insignificantly and made 228.6 ± 31.4 and 247.6 ± 36.8 , respectively.

Збереженість та окисний гомеостаз кріоконсервованої гемопоетичної тканини пуповинної крові

Т.О. КАЛИНИЧЕНКО¹, М.Ю. АНОШИНА¹, В.В. БАЛАН², Ж.М. МІНЧЕНКО², Г.Т. ГЛУХЕНЬКА¹

¹ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», м. Київ

²ДУ «Науковий центр радіаційної медицини НАМН України», м. Київ

Survival and Oxidative Homeostasis of Cryopreserved Umbilical Cord Blood Hemopoietic Tissue

T.O. KALINICHENKO¹, M.YU. ANOSHINA¹, V.V. BALAN², Zh.M. MINCHENKO², G.T. GLUKHENKA¹

¹Institute of Haematology and Transfusiology

of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Research Center for Radiation Medicine of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Пуповинна кров (ПК) на сьогодні є загально визнаним джерелом гемопоетичної тканини (ГТ) для трансплантації реципієнтам із мієлосупресіями. Створення запасів ПК в умовах наднизьких температур вимагає постійного вдосконалення технологій консервування. Використання останніх наукових здобутків у сфері вивчення резервних можливостей виживання клітин у екстремальних умовах є реальним шляхом досягнення мети максимальної збереженості матеріалу. Відомо, що суттєві зміни гомеостазу клітин прямо пов'язані з серйозними наслідками щодо їхньої життєдіяльності. Тому для попередження пошкодження трансплантата ГТ ПК при кріоконсервуванні необхідно проводити детальний аналіз розвитку зазначених процесів під час виконання технологічних стадій із подальшим внесенням корективів.

У роботі представлені результати аналізу зміни морфофункціональних характеристик ядровмісних клітин (ЯВК) ПК та окисного гомеостазу за показниками перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) на етапах кріоконсервування.

Зразки ПК, що отримували методом «замкненої» системи, вивчали в процесі обробки, заморожування з використанням кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) у кінцевій концентрації 5% (Пат. UA №56992, від 10.02.2011), а також після відтаювання. Збереженість ЯВК досліджували за вмістом субпопуляцій, життєздатністю, проліферативною функцією гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників гемопоєзу. Активність процесів ПОЛ досліджували спектрофотометричним методом (за Волчегорським І.А. у модифікації Аношиної М.Ю. та співавт.). При цьому визначали концентрацію дієнових, триєнових, оксодієнових кон'югатів, кінцевих продуктів типу шифових основ, а також субстратів ПОЛ (за вмістом ізольованих подвійних зв'язків).

Було доведено, що внесення кріопротектора ДМСО до суспензії клітин на підготовчому до заморожування етапі суттєво впливає не тільки на збереженість ЯВК ПК (життєздатність і функціональну активність), а й на їхній окисний гомеостаз. Встановлено також наявність істотної активації процесів ПОЛ у момент розморожування. Отримані результати достовірного зниження показників ПОЛ на стадії концентрації клітин, засвідчуючи високий рівень ендогенних антиоксидантів у одиниці об'єму суспензії, вказують на один із можливих шляхів вирішення проблеми підвищення якості розмороженої ГТ.

Виявлений факт суттєвого реагування системи окисного гомеостазу та якісних характеристик клітин у зразках ПК на вплив чинників кріоконсервування є підставою для вдосконалення технологічного процесу на окремих його стадіях.

Nowadays umbilical cord blood (UCB) is widely used source for transplantation of hemopoietic tissue (HT) to recipients with myelosuppression. Storage of UCB under ultra low temperatures requires continuous improvement of preservation technologies. Using the most recent scientific achievements in study of spare capacity of cell survival under extreme conditions is actual way to achieve the maximal preservation of the material. It is known that significant changes in cell homeostasis are directly associated with serious impact on their vital activities. Therefore, to prevent damage of UCB HT transplant during cryopreservation it is necessary to analyze in details these processes when performing technologic stages with their further corrections.

In the research there are presented the analysis results of changes in morphological and functional characteristics of UCB nucleated cells (NCs) and oxidative homeostasis according to indices of lipid peroxidation (LPO) during cryopreservation.

Samples of UCB, derived in 'closed' system, were studied during treatment, freezing with cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) at final concentration of 5% (Patent UA № 56992 from 10.02.2011) as well as post thaw. Survival of NCs was investigated by sub-population composition, viability, proliferative function of granulocyte-macrophage progenitors of haemopoiesis. Activity of LPO was investigated with spectrophotometric method (according to Volchegorsky I.A. modified by Anoshina M.Yu. *et al.*). Here-with there was determined concentration of diene, triene, oxodiene conjugates, and final products such as Schiff bases, as well as LPO substrates (for content of isolated double bonds).

It has been shown that introduction of DMSO cryoprotectant into cell suspension during preparation to freezing significantly affects not only the survival of UCB NCs (viability and functional activity), but also their oxidative homeostasis. It was established the presence of significant activation of LPO during freeze-thawing. The obtained results of significant reduction of LPO indices at cell concentration, indicating a high level of endogenous antioxidants in unit of suspension volume, pointing to one of the possible way to solve the problem of improving the quality of frozen-thawed HT.

The revealed fact of significant response of oxidative homeostasis and qualitative characteristics of cells in UCB samples on effect of cryopreservation factors is the basis for improving technological process at its certain stages.

Сравнительная характеристика гемопоэтических прогениторных клеток, полученных из нативной и криоконсервированной ткани плаценты и пуповинной крови человека

М.Д. Кучма^{1,2}, В.А. ШАБЛИЙ^{1,2}, В.М. КИРИК³, А.Н. ОНИШЕНКО², Л.Л. ЛУКАШ¹, Г.С. ЛОБЫНЦЕВА²

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев

²Институт клеточной терапии, г. Киев

³ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», г. Киев

Comparative Characteristics of Hemopoietic Progenitor Cells Derived From Native and Cryopreserved Placental Tissue and Human Cord Blood

M.D. KUCHMA^{1,2}, V.A. SHABLIY^{1,2}, V.M. KIRIK³, A.N. ONISCHENKO², L.L. LUKASH¹, G.S. LOBYNTSEVA²

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

²Institute of Cell Therapy, Kiev, Ukraine

³Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

В последнее время было установлено, что плацента играет важную роль в фетальном гемопоэзе. Было показано, что гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) мигрируют в аллантаис еще до образования хориоаллантаиса. Количество ГСК в плаценте в несколько раз выше, чем в фетальной печени и области аорты, гонад и мезонефроса. Цель данной работы – показать возможность получения жизнеспособных гемопоэтических прогениторных клеток (ГПК) из нативной и криоконсервированной плаценты и провести сравнительный фенотипический анализ с ГПК, выделенных из ткани и пуповинной крови.

Криоконсервирование ткани плаценты осуществляли по специально разработанной программе замораживания. Выделенные ферментативно клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием CD34, CD90, CD45, CD31, CD235, CD7, CD33 антител (BD, USA). При клональном анализе использовали культуральную среду «MethoCult» («StemCellTech», Канада).

По результатам FACS-анализа в плаценте присутствуют популяции клеток CD34^{low}CD45^{low} и CD34^{hi}CD45^{low}. Уровень экспрессии CD90 на ГПК из ткани плаценты статистически достоверно выше, чем на ГПК пуповинной крови, а именно 24,5% (6,2–49,8) и 2,2% (0,08–10,5) соответственно. ГПК из плацентарной ткани имели более высокий уровень экспрессии CD31 по сравнению с кордовой кровью. Анализ микропопуляций гемопоэтических клеток показал наличие в плаценте CD34⁺CD235⁺-клеток в количестве 0,28% (0,0001–1,1609), тогда как в пуповинной крови такой популяции не наблюдалось; процентное содержание CD34⁺CD7⁺, полученных из ткани плаценты, достоверно выше, чем в кордовой крови: 0,10% (0,03–0,24) и 0,01% (0,01–0,12) соответственно; популяция с фенотипом CD34⁺CD33^{dim} составляла 0,58% (0,18–1,21) для плаценты и 0,13% (0,03–0,30) для пуповинной крови. При выделении из криоконсервированной плаценты в популяции CD34⁺CD45^{low} присутствует больше SSC^{low} клеток по сравнению с нативной тканью: 85,6% (68,9–96,5) и 60,8% (44,9–75,6) соответственно. Содержание ГПК(CD34⁺CD45^{low}SSC^{low}) среди всех гемопоэтических клеток (CD45⁺) из нативной и криоконсервированной плаценты было около 1% (0,66% (0,36–1,05) и 1,11% (0,18–2,82) соответственно). При культивировании клеток, выделенных из нативной и криоконсервированной плаценты, наблюдался рост грануломоноцитарных, моноцитарных, гранулоцитарных и эритроидных колоний; соотношение разных типов колоний, образованных клетками плаценты и пуповинной крови, не отличался.

Recently the placenta was established to play an important role in fetal hemopoiesis. Hemopoietic stem cells (HSCs) were demonstrated as migrating into allantois even before chorio-allantois formation. A number of HSCs in placenta is several times higher than in fetal liver and the area of aorta, gonads and mesonephros. The research aim was to demonstrate the possibility of procurement of viable hemopoietic progenitor cells (HPCs) from native and cryopreserved placenta and perform a comparative phenotypic analysis with HPCs, isolated from tissue and cord blood.

Placental tissue cryopreservation was carried-out by the specially designed program of freezing. The cells, isolated in an enzymatic way were analyzed by the flow cytometry method using CD34, CD90, CD45, CD31, CD235, CD7, CD33 antibodies (BD, USA). In clonal analysis we used the culture medium MethoCult (StemCell Tech., Canada).

According to the results of FACS-analysis the placenta contains the populations of cells CD34^{low}CD45^{low}CD34^{hi}CD45^{low}. The level of CD90 expression on HPCs of placental tissue was statistically and significantly higher than on cord blood HPCs, that was 24.5% (6.2–49.8) and 2.2% (0.08–10.5), correspondingly. The HPCs from placental tissue had a higher level of CD31 expression compared to cord blood ones. The analysis of hemopoietic cell micropopulations showed the presence in placenta of CD34⁺CD235⁺ cells in the amount of 0.28% (0.0001–1.1609), while in cord blood this population was not observed, the percentage of CD34⁺CD7⁺ cells, derived from placental tissue was statistically and significantly higher than in cord blood: 0.10% (0.03–0.24) and 0.01% (0.01–0.12), respectively; a population with CD34⁺CD33^{dim} phenotype comprised 0.58% (0.18–1.21) for placenta and 0.13% (0.03–0.30) for cord blood. Isolation from cryopreserved placenta resulted in presence of higher content of SSC^{low} cells in CD34⁺CD45^{low} population compared to a native tissue: 85.6% (68.9–96.5) and 60.8% (44.9–75.6), respectively. The HPCs content (CD34⁺CD45^{low}SSC^{low}) among all the hemopoietic cells (CD45⁺) in native and cryopreserved placenta was about 1% (0.66% (0.36–1.05) and 1.11% (0.18–2.82), correspondingly. When culturing cells, isolated from native and cryopreserved placenta, there was observed a growth of granulo-monocytic, monocytic, granulocytic and erythroid colonies, the ratio of different types of colonies, formed by cells of placenta and umbilical blood did not differ.

Криоконсервированная сыворотка плацентарной крови человека и ее биологическая активность при экспериментальном атеросклерозе у кроликов

О.В. ФАЛЬКО, О.В. ЛИПИНА, В.В. ВОЛИНА, О.С. ПРОКОПЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreserved Human Placenta Blood Serum and its Biological Activity during Experimental Atherosclerosis in Rabbits

O.V. FALCO, O.V. LIPINA, V.V. VOLINA, O.S. PROKOPYUK

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

Применение криоконсервированной сыворотки плацентарной крови человека (СПКЧ) имеет большое практическое значение. Показана эффективность СПКЧ при ряде патологий.

Цель работы – изучение сохранности СПКЧ при низкотемпературном консервировании, а также исследование ее биологической активности на примере модели экспериментального атеросклероза у кроликов.

Проведенные исследования показали, что оптимальными режимами, обеспечивающими сохранность фракционного состава белков и уровня гормонов в СПКЧ, являются медленное замораживание со скоростью 3–4 град/мин до –20°C, хранение в течение 6 месяцев, а также быстрое замораживание путем погружения в жидкий азот (300–400 град/мин) и хранение более 5 лет.

Было установлено, что моделирование атеросклероза у кроликов с использованием холестериновой диеты в течение 6 месяцев приводило к повышению уровня общего холестерина (ОХ) более чем в 20 раз, триглицеридов (ТГ) – в 10–16 раз, уровня липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) – почти в 40 раз. При этом уровень антиатерогенной фракции липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) превышал исходное значение в 2 раза. Выраженная гиперхолестеринемия приводила к гиперплазии и ожирению клеток паренхимы надпочечников и уменьшению их плотности. Наблюдалось нарушение целостности эндотелиального слоя аорты, что видно было по уменьшению показателя смежности эндотелиоцитов. Площадь очагов липоидоза в грудном отделе аорты на пике развития модели атеросклероза составляла 65–70%.

Введение криоконсервированной СПКЧ кроликам с экспериментальным атеросклерозом на пике модели приводило к более раннему снижению в их крови уровня ОХ, ТГ и ЛПНП и повышению уровня ЛПВП почти в 5 раз в сравнении с самопроизвольным регрессом. К концу эксперимента (6 месяцев после отмены холестериновой диеты) уровень ЛПВП снижался и приближался к его показателю у интактных животных. При этом значительно снижалась площадь липоидоза аорты (до 12%), восстанавливались целостность эндотелиального слоя аорты и структура паренхимы надпочечников.

Таким образом, было доказано, что применение криоконсервированной сыворотки плацентарной крови человека является эффективным способом при коррекции изменений, вызванных гиперхолестеринемией, в организме животных с экспериментальным атеросклерозом.

Application of cryopreserved human placenta blood serum (HPBS) is of great practical value. HPBS efficiency has been shown in the range of pathologies.

Research aim was to study the HPBS survival during low temperature cryopreservation and investigate its biological activity in the model of experimental atherosclerosis in rabbits.

The performed investigations have shown that optimal regimens providing the integrity of protein fractional composition and hormone level in HPBS are slow freezing with 3–4°C/min down to –20°C, storage for 6 months as well as rapid freezing by plunging into liquid nitrogen (300–400°C/min) and storage for more than 5 years.

We have established that modeling of atherosclerosis in rabbits with cholesterol diet during 6 months induced the increase of total cholesterol (TC) level more than 20 times, triglyceride (TG) – 10–16 times, low density lipoproteins (LDLP) level – almost 40 times. Moreover the level of antiatherogenic fraction of high density lipoproteins (HDLP) 2 times exceeded the initial indices. Expressed hypercholesterolemia led to the hyperplasia and obesity of cells of adrenal gland parenchyma and their density decrease. The damage of aorta endothelial layer integrity was observed obviously by the decrease of endotheliocytes' adjacency index. The area of lipidosis foci in thoracic aorta at the height of atherosclerosis development made 65–70%.

Introduction of cryopreserved HPBS into rabbits with experimental atherosclerosis at the height of model induced earlier the decrease in their blood of TC, TG and LDLP levels and 5 times increase of HDLP level if compared to a spontaneous regression. To the end of experiment (6 months after cessation of cholesterol diet) HDLP level decreased and approached its index in intact animals. Furthermore the square of aorta lipidosis significantly decreased (down to 12%), integrity of aorta endothelial layer and adrenal gland parenchyma structure recovered.

So, we have proved that the use of cryopreserved human placenta blood serum is an efficient way to correct the changes induced by hypercholesterolemia in animal organisms with experimental atherosclerosis.

Влияние криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у молодых крыс

Л.В. БАБИЙЧУК, В.Г. БАБИЙЧУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreserved Cord Blood Nucleated Cells on State of Vegetative Regulation of Heart Rate in Young Rats

L.V. BABYCHUK, V.G. BABYCHUK

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

Одной из важнейших задач медицины является поиск подходов и методов, способных повысить устойчивость организма к развитию различного рода заболеваний. Современные методы анализа волновой структуры сердечного ритма позволили по данным вариабельности сердечного ритма (ВСР) оценить общее функциональное состояние организма и его адаптационные резервы. Исследования последних лет подтверждают высокий потенциал применения в медицинской практике кордовой крови (КК), содержащей гемопоэтические стволовые клетки (ГСК).

В данной работе изучали влияние криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК) на показатели спектрального анализа ВСР у молодых крыс.

Работа выполнена на молодых белых крысах-самцах (6 месяцев) линии Вистар в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Размороженный препарат ЯСК КК в аутоплазме, содержащий ГСК, вводили внутривентрикулярно из расчета 1×10^5 CD34⁺-клеток на 1 кг массы тела. В динамике эксперимента (на следующие сутки, через 3 суток, неделю и месяц после введения животным препарата ЯСК КК) регистрировали ЭКГ на электрокардиографе серии «Поли-Спектр» в шести стандартных отведениях. Спектральный анализ ВСР проводили с помощью программы «Поли-Спектр-Ритм».

На следующие сутки и через 3 суток после введения препарата ЯСК КК у молодых животных значения общей спектральной мощности значительно возрастали по сравнению с контрольными. Ее подъем был результатом повышения функционального состояния вегетативных центров за счет активации симпатического и парасимпатического отдела вегетативной нервной системы (ВНС). Через неделю после введения препарата ЯСК КК незначительно возрастал вклад гуморального звена регуляции в структуру общей спектральной мощности, однако заметно уменьшалась активность симпатического отдела ВНС. В отдаленные сроки наблюдения (через месяц после введения препарата) у молодых животных еще более существенный рост общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции был следствием активации гуморального звена регуляции.

Таким образом, полученные экспериментальные данные (высокий уровень вагальных, симпатических влияний в модуляции сердечного ритма на фоне введения препарата ЯСК КК) свидетельствуют о наличии у молодых крыс развитой сбалансированной вегетативной регуляции.

One of the most important tasks of medicine is the search for approaches and methods capable to increase an organism's resistance to the development of various diseases. Current methods of analysis of heart rate wave structure allowed according to the heart rate variability (HRV) evaluating the general organism's functional state and its adaptation reserves. Recent studies show a high potential of use in medical practice of cord blood (CB) containing hematopoietic stem cells (HSCs).

In this work we studied the effect of cryopreserved cord blood nucleated cells (CB NCs) on the indices of spectral analysis of HRV in young rats.

The study has been performed in young white male Wistar rats (6 months) according to the General Principles of Experiments in Animals approved by the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, 2007) and agreed with the Regulations of the European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Frozen-thawed preparation of CB NCs in autoplasmaccontaining HSCs was intraperitoneally injected in amount of 1×10^5 CD34⁺ cells per 1 kg of body weight. In the dynamics of the experiment (next day, in 3 days, week and month after injection of CB NCs in animals) ECG was recorded using electrocardiograph Poly-Spectrum in six standard derivations. Spectral analysis of HRV was performed with Poly-Spectrum-Rhythm software.

On the following day and in 3 days after injection of CB NCs preparation the values of total spectral power in young animals significantly increased if compared to the control ones. Its rise was the result of increasing the functional state of the vegetative centers due to the activation of sympathetic and parasympathetic divisions of vegetative nervous system (VNS). In a week after CB NCs injection the contribution of regulation humoral link in the structure of total spectral power slightly increased but the activity of VNS sympathetic division significantly decreased. One month after injection of the preparation young animals had more significant increase of total spectral power of neurohumoral regulation which was the result of humoral regulation activation.

Thus, the obtained experimental data (high level of vagal, sympathetic effects in the modulation of heart rate on the background of CB NCs injection) indicate the presence of developed balanced vegetative regulation in young rats.

Состояние АФК-продуцирующей и антиоксидантной системы криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови

В.В. РЯЗАНЦЕВ, Л.А. БАБИЧУК, О.А. МИХАЙЛОВА, П.М. ЗУБОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

State of ROS-Producing and Antioxidant Systems in Cryopreserved Cord Blood Nucleated Cells

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

L.V. BABYCHUK, V.G. BABYCHUK

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

Эффективность применения фракции криоконсервированных ядросодержащих клеток (ЯСК) кордовой крови (КК) определяется не только достаточным их количеством, но и сохранением функциональной полноценности как после выделения из цельной крови, так и в процессе криоконсервирования. Одним из объективных критериев полноценности ЯСК является оценка их метаболического состояния по продукции активных форм кислорода (АФК) и активности антиоксидантной системы (АОС) клеток.

Целью работы было определение содержания активных форм кислорода в ЯСК КК и изучение состояния их АОС до и после криоконсервирования.

Производство АФК ядросодержащих клеток КК оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием DCFH₂-DA, который при наличии в клетке АФК переходит в высокофлуоресцентную форму DCF. Состояние АОС клеток оценивали после добавления в суспензию клеток экзогенной H₂O₂ в концентрации 250 мкмоль. Показано, что активация образования АФК зависит от метода выделения клеток из пуповинной крови и используемого криопротектора. Наиболее эффективным являлся метод двухэтапного центрифугирования цельной пуповинной крови с получением концентрата ЯСК в аутоплазме. Метод криоконсервирования ЯСК под защитой 5%-го раствора ДМСО в наименьшей степени приводил к активации образования АФК в клетках. При исследовании особенностей образования АФК разными популяциями ЯСК было показано, что как в цельной КК, так и после выделения клеток, обработки их криопротектором и после замораживания-оттаивания наибольший вклад в общий уровень флуоресцирующей формы DCF вносит популяция моноцитов, в то время как лимфоциты и гранулоциты образуют меньшее количество внутриклеточных АФК.

Подобный дисбаланс окислительного метаболизма клеток, возникающий на разных этапах криоконсервирования, может быть связан с состоянием ферментов антиоксидантной защитной системы (каталаза, GS-пероксидаза, СОД), которую оценивали после добавления в суспензию клеток экзогенной H₂O₂. Показано, что после замораживания-отогрева временная динамика АФК отличалась от таковой в клетках до замораживания и характеризовалась отсутствием существенного снижения АФК в первые 15 мин инкубации с H₂O₂, но с течением времени данные различия нивелировались и содержание АФК снижалось до базового уровня в цельной КК, что свидетельствует о восстановлении работы АОС клеток после криоконсервирования. Основной вклад в этот процесс происходит за счет популяций моноцитов и гранулоцитов, а лимфоциты сохраняют высокую активность АОС.

Application efficiency of the fraction of cord blood (CB) cryopreserved nucleated cells (NC) is determined not only by the number but also by the preservation of functional integrity both after isolation from the whole blood and during cryopreservation. One of objective criteria of NC integrity is the estimation of their metabolic state by the production of reactive oxygen species (ROS) and activity of antioxidant system (AOS) in the cells.

The research aim was the examining of reactive oxygen species content in CB NC and investigation of their AOS state prior to and after cryopreservation.

ROS production of CB nucleated cells was assessed by means of flow cytometer using DCFH₂-DA which in the presence of ROS in a cell transforms into highly fluorescent form of DCF. State of cell AOS was assessed after adding into cell suspension of exogenous H₂O₂ in 250 μmol concentration. It has been shown that activation of ROS formation depends on the method of cell isolation from umbilical blood and the cryoprotectant used. The most effective was the method of two-stage centrifugation of the whole cord blood with obtaining the NC concentration in autoplasm. Cryopreservation method for NC under 5% DMSO protection in less extent resulted into activation of ROS formation in cells. When studying the peculiarities of the ROS formation by different NC populations it has been shown that both in the whole CB and after isolation of the cells, treating them with cryoprotectant and after freeze-thawing the biggest contribution into the total level of fluorescent form of DCF was done by population of mono-cytes, while the lymphocytes and granulocytes form the less amount of intracellular ROS.

Such a disbalance in cell oxidative metabolism appearing at different cryopreservation stages can be related to the state of enzymes of antioxidant defence system (catalase, GS-peroxidase, SOD) which was estimated after adding into cell suspension of exogenous H₂O₂. It has been demonstrated that after freeze-thawing the temporal dynamics of ROS formation differed from the one in cells prior to freezing and was characterized by the absence of significant reduction of ROS content in the first 15 min of incubation with H₂O₂, but with time these differences were levelled and ROS content decreased down to base level in the whole CB, testifying to the restoration in cell AOS activity after cryopreservation. Populations of monocytes and granulocytes mainly contribute to this process and lymphocytes preserve a high activity of AOS.

Влияние кордовой крови и экстремального охлаждения на иммунологический статус животных в условиях хронической алкоголизации

И.И. ЛОМАКИН, О.В. КУДОКОТСЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cord Blood and Extreme Cooling on Immunological Status of Animals with Chronic Alcoholization

I.I. LOMAKIN, O.V. KUDOKOTSEVA

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

Клеточные препараты кордовой крови человека (ККЧ) представляют собой новый класс современных иммуномодуляторов, действующих на все звенья клеточного и гуморального иммунитета. Еще одним способом коррекции нарушений как врожденного, так и адаптивного иммунитета могут быть экстремально низкие температуры (-120°C). Цель данной работы – выяснить влияние клеточных препаратов ККЧ и экстремально низких температур (ЭНТ) на состояние иммунитета крыс с хроническим алкоголизмом. Для характеристики иммунного статуса использовали классические методы оценки фагоцитарной активности лейкоцитов, НСТ-тест, гистохимические методы оценки неспецифической эстеразы (НЭ) и кислой фосфатазы (КФ). Время наблюдения за животными составляло 3 ч, 3 суток и 1 месяц.

Показано, что хроническая алкоголизация (ХА) крыс приводит к стойкой лейкопении. Введение препаратов ККЧ способствовало постепенному увеличению количества лейкоцитов в опытных группах, хотя эти цифры не достигали уровня контроля к моменту окончания эксперимента. Сочетанное воздействие ККЧ и ЭНТ на животных с ХА приводило к стабильному увеличению уровня лейкоцитов на протяжении всего срока наблюдения, что можно объяснить как иммунокорригирующим действием стволовых гемопоэтических клеток ККЧ на гемопоэз опытных крыс, так и улучшением доставки этих клеток в органы кроветворения посредством влияния экстремальной аэрокриотерапии на микроциркуляторное русло животных. Интоксикация при ХА вызывала заметное снижение фагоцитоза (фагоцитарной активности и фагоцитарного числа), при этом достоверно падал и уровень завершенности фагоцитоза, большинство микробных клеток, захваченных фагоцитом, оставались не переваренными в течение всего времени постановки реакции. Сочетанное применение ЭНТ и препаратов ККЧ у крыс с ХА приводило к достоверному повышению количества захватываемых фагосомами микробных клеток и возрастанию показателя завершенности фагоцитоза. Препараты ККЧ и сочетанное их применение с ЭНТ достоверно повышали готовность фагоцитов, ингибированных клеточным ядом – этанолом, к активному захвату и перевариванию микробных частиц, о чем свидетельствовали показатели НСТ-теста.

Таким образом, этанол, являясь универсальным цитоплазматическим ядом, обладает разрушающим действием на все системы, в частности на иммунную систему организма. Подавление иммунной системы проявляется в снижении важнейших защитных механизмов организма – фагоцитозе, активности лизосомальных ферментов – КФ и НЭ, а также общего количества лейкоцитов. Терапия препаратами ККЧ в сочетании с применением ЭНТ дает значимый эффект в коррекции иммунных нарушений организма, активизируя как иммуно- и гемопоэз, так и фагоцитарные свойства лейкоцитов.

Cell preparations of human cord blood (HCB) represent a new class of modern immunomodulators affecting all the links of cell and humoral immunity. Extremely low temperatures (-120°C) may be one more way for correction of genetic and adaptive immunity. Research aim was to reveal the effect of HCB cell preparations and extremely low temperatures (ELTs) on immunity state of rats with chronic alcoholism. To characterize an immune status we used traditional methods for evaluation of leukocyte phagocytic activity, Nitro Blue Tetrazolium Reduction (NBTR) Test, histochemical methods for evaluation of non-specific esterase (NE) and acid phosphatase (AP). Time of observation for animals made 3 hrs, 3 days and 1 month.

Chronic alcoholization (CA) of rats has been shown to induce a persistent leukopenia. Introduction of HCB preparations contributed to a gradual increase of leukocytes number in experimental groups but these values did not approach the control level to the end of experiment. Combined exposures of HCB and ELT on animals with CA led to a constant increase of leukocytes level throughout the observation period which can be explained as an immunocorrecting effect of HCB stem hemopoietic cells on hemopoiesis of experimental rats as well as improving delivery of these cells to the organs of hemopoiesis by effect of extreme aerocryotherapy on microhemocirculatory bed of animals. Intoxication during CA caused a significant decrease of phagocytosis (phagocytic activity and phagocytic number) moreover the level of phagocytosis completeness significantly decreased; most microbial cells captured by phagocyte remained undigested during the reaction. Combined application of ELT and HCB preparations in rats with CA induced a significant increase of number of microbial cells captured by phagosomes and increase of phagocytosis completeness index. HCB preparations and their combined use with ELT significantly raised the readiness of phagocytes inhibited by cell poison, ethanol, to an active capture and digestion of microbial particles that was confirmed by NBTR Test.

So, ethanol as a universal cytoplasmic poison has a destructive effect on all the systems, in particular, organism's immune system. Suppression of immune system is manifested in decrease of the organism's most important protective mechanisms: phagocytosis, decrease of lysosome enzymes (AP and NE) activity as well as decrease of a total number of leukocytes. Therapy with HCB preparations and ELT significantly affect the correction of the organism's immune disorders activating immuno- and hemopoiesis as well as phagocytic properties of leukocytes.

Роль криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови в коррекции вторичных иммунодефицитных состояний вирусного генеза

О.Ю. КОЖИНА, М.В. ОСТАНКОВ, Н.А. БОНДАРОВИЧ, М.А. КРАВЧЕНКО, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Role of Cryopreserved Cord Blood Leucoconcentrate in Correction of Secondary Immunodeficiencies of Viral Origin

O.YU. KOZHINA, M.V. OSTANKOV, N.A. BONDAROVICH, M.A. KRAVCHENKO, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Известно, что инфекции респираторного тракта приводят к формированию вторичного иммунодефицита. На основе кордовой крови человека, являющейся биогенным иммуномодулятором, в ИПКиК НАНУ был разработан способ получения криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови человека (кЛККЧ) в аутологичной плазме [Цуцаева А.А., 1999]. В предварительных исследованиях была обнаружена противовирусная активность кЛККЧ. Цель работы – изучение механизмов противовирусного действия кЛККЧ и его компонентов (ядросодержащие клетки (ЯСК), плазма) на основании исследования состояния органов лимфогемопоэтической системы (ЛГПС) (тимуса, лимфоузлов, селезёнки, костного мозга) на экспериментальной модели вирусной инфекции.

Эксперименты проводили на мышах линии Balb/c. Животным ($n = 20$ для каждой группы) за 6 месяцев до инфицирования вводили: 1, 2, 3 – кЛККЧ, плазму и ЯСК по 0,05 мкл/мышь интраназально; 4 – вирус гриппа в дозе LD25/10; 5 – лаферобион (по 14 МЕ/мышь интраназально 5 раз в день 3 дня); 6 – 0,9% NaCl (0,05 мкл/мышь). Контролем служили интактные и неинфицированные животные опытных групп. Мышей заражали интраназально вирусом гриппа штамм А/Виктория в дозе LD100/10. Выживаемость животных оценивали ежедневно в течение 14 суток развития вирусной инфекции. На 7 и 14-е сутки изымали для определения массы органов и содержания клеток органы ЛГПС. Количество клеток в 1 мл суспензии, полученной после мягкой гомогенизации, подсчитывали в камере Горяева. В селезёнке оценивали содержание CD16/32⁺CD210⁺-клеток с использованием моноклональных антител на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США).

Показано, что на фоне развития вирусной инфекции у животных 5 и 6 групп отмечалась 100%-я летальность к 10-м суткам, при этом выявлено угнетение функциональной активности центральных органов ЛГПС. Превентивное введение кЛККЧ и его компонентов оказывало разнонаправленное действие на состояние органов ЛГПС, обеспечивая максимальную выживаемость до 85% к 14-м суткам развития вирусной инфекции. Наиболее сбалансированный эффект оказывало введение цельного кЛККЧ, выражавшееся в нормализации состояния органов ЛГПС к 14-м суткам, что коррелировало с повышением функциональной активности клеток моноцитарно-фагоцитарной системы. Итак, превентивное введение кЛККЧ повышает функциональную активность неспецифического звена иммунного ответа, что обеспечивает формирование резистентности к вирусу гриппа в течение 6 месяцев.

It is known that respiratory tract infections lead to the formation of secondary immunodeficiency. On the basis of human cord blood, being biogenic immune modulator at the IPC&C was developed to obtain the cryopreserved human cord blood leucoconcentrate (CHCBL) in autologous plasma [Tutsayeva A., 1999]. In preliminary studies, antiviral activity of CHCBL was detected. The research aim was to study the mechanisms of antiviral effect of CHCBL and its components (nucleated cells (NCs), plasma) based on the studies of the state of lymphohemopoietic system (LHPS) (thymus, lymph nodes, spleen, bone marrow) in experimental model of viral infection.

The experiments were performed in BALB/C mice. The animals ($n = 20$ for each group) for 6 months prior to infection were administered with: 1, 2, 3 – CHCBL, plasma and NCs by 0.05 μ l/ mouse intranasally; 4 – influenza virus in a dose of LD25/10; 5 – Laferobion (by 14 IU/mouse intranasally 5 times daily for 3 days); 6 – 0.9% NaCl (0.05 μ l/ mouse). The control was intact and non-infected animals of the experimental group. The mice were intranasally infected with influenza virus strain A/Victoria in a dose of LD100/10. The survival of animals was assessed daily for 14 days of viral infection development. To the 7th and day 14th days LHPS organs were taken away to determine the weight and content of cells. The number of cells per 1 ml of the suspension obtained after mild homogenization was counted in Goryaev's chamber. In the spleen there was assessed the content of CD16/32⁺CD210⁺ cells using monoclonal antibodies and flow cytometer FACS Calibur (BD, USA).

It has been shown that on the background of viral infection in the animals of groups 5 and 6 there was observed 100% mortality to the 10th day, herewith there was revealed an inhibition of functional activity of central organs of LHPS. Preventive administration of CHCBL and its components provided various effects on the state of LHPS with maximum survival up to 85% to the 14th day of viral infection. The most balanced effect was rendered by the introduction of the whole CHCBL, expressed in the normalization of the state of LHPS organs to the 14th day, which correlated with an increased functional activity of monocyte-phagocytic system. Thus, the introduction of preventive CHCBL increases the functional activity of non-specific components of immune response, providing the formation of resistance to influenza virus for 6 months.