

Оценка фагоцитарной активности криоконсервированных с диметилацетамидом нейтрофилов лейкоконцентрата после реабилитации в среде, содержащей низкомолекулярную фракцию кордовой крови (до 5 кДа)

UDC 611.018.5.013.8:612.112.3.014.43

A.K. GULEVSKY, YU.S. AKHATOVA*, N.N. MOISEEVA,
O.L. GORINA, V.V. CHIZHEVSKY, L.V. STEPANYUK

Assessment of Phagocytic Activity of Leukoconcentrate Neutrophils Cryopreserved with Dimethyl Acetamide after Post-Thaw Rehabilitation in Medium Containing Cord Blood Low-Molecular Fraction (Below 5 kDa)

Изучали влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови крупного рогатого скота на функциональную активность лейкоцитов донорской крови человека после криоконсервирования. Отмечено стимулирующее действие фракции (0,15 мг/мл) в составе реабилитирующей среды для деконсервированных нейтрофилов на их поглотительную и переваривающую активность. Установлено, что использование 5% диметилацетамида (ДМАц) в качестве криопротектора позволяет сохранить до 80% жизнеспособных лейкоцитов.

Ключевые слова: низкомолекулярная фракция кордовой крови, криоконсервирование, нейтрофилы, реабилитирующая среда.

Вивчали вплив низькомолекулярної фракції (до 5 кДа) кордової крові великої рогатої худоби на функціональну активність лейкоцитів донорської крові людини після криоконсервування. Виявлено стимулюючу дію фракції (0,15 мг/мл) у складі реабілітуючого середовища деконсервованих нейтрофілів на їх поглинальну та переварюючу активність. Визначено, що використання диметилацетаміду (5%) в якості криопротектора дозволяє зберегти до 80% життєздатних лейкоцитів.

Ключові слова: низькомолекулярна фракція кордової крові, криоконсервування, нейтрофіли, реабілітуюче середовище.

The influence of the cattle cord blood low-molecular fraction (below 5 kDa) on the functional activity of leukocytes after cryopreservation was studied. The stimulating effects of the fraction (0.15 mg/ml) on digesting and engulfing activities of frozen-thawed neutrophils were observed. It was established that the usage of dimethyl acetamide (5%) as a cryoprotectant allowed preserving up to 80% of viable leukocytes.

Key words: cattle cord blood low-molecular fraction, cryopreservation, neutrophils, rehabilitating medium.

Эффективным средством лечения пациентов с гематологическими и онкологическими заболеваниями различного генеза является трансфузия лейкоцитов. При этом обязательное условие для достижения лечебного эффекта – введение пациенту больших доз функционально активных зрелых гранулоцитов, долгосрочное хранение которых невозможно при положительных температурах [2, 11, 12]. Поэтому вопросы совершенствования методов хранения лейкоцитов при ультранизких температурах, а также поиск способов восстановления их функциональной активности после размораживания сохраняют свою актуальность.

Transfusion of leukocytes is an effective method of treatment for patients with hematological and oncological diseases of different genesis. Thereat, an essential condition for achieving the positive effect is introduction into patient of large doses of functionally active mature granulocytes, long-term storage of which is not possible at positive temperatures [2, 11, 12]. So the problems of improving the methods of leukocytes storage at ultra low temperatures as well as search of the ways to recover their functional activity after thawing are of relevance.

Our investigations showed [4] that the method of leukoconcentrate freezing with DMSO in final concen-

В наших исследованиях было показано [4], что метод замораживания лейкоконцентрата с ДМСО в конечной концентрации 7,5% позволяет сохранить до $98,29 \pm 0,34\%$ лимфоцитов и $97,15 \pm 1,04\%$ моноцитов. Но при этом по данным проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентного ДНК-красителя 7-AAD, количество жизнеспособных гранулоцитов не превышает $22,22 \pm 1,80\%$, что является предпосылкой для выбора более эффективного криопротектора. Одним из эффективных по отношению к клеткам гранулоцитарного ряда криопротекторов является диметилацетамид (ДМАц) [2, 7, 12].

Известно, что даже при оптимальных режимах замораживания в клетках гранулоцитарного ряда происходят повреждения, связанные с их структурными особенностями [11, 12]. Поэтому необходима реабилитация деконсервированных лейкоцитов в средах, способствующих восстановлению их функциональной активности. После инкубации деконсервированных лейкоцитов в среде, содержащей низкомолекулярную (до 5 кДа) фракцию кордовой крови (ФКК), повышается фагоцитарная активность нейтрофилов [4].

Цель работы – изучение влияния низкомолекулярной фракции кордовой крови на фагоцитарную активность нейтрофилов, криоконсервированных под защитой 5% DMAц.

Материалы и методы

Объектом для исследования был лейкоконцентрат, выделенный из донорской крови человека группы А(II) методом седиментации эритроцитов декстраном [5].

Концентрат лейкоцитов под защитой DMAц в конечной концентрации 5% криоконсервировали в режиме медленного охлаждения [1, 12]. Криозащитный раствор, состоящий из DMAц, глюкозы, ЭДТА Na₂ и воды для инъекций, готовили *ex tempore*. Соотношение объемов клеточной суспензии и раствора DMAц составляло 3:1 [12]. Раствор DMAц в суспензию вносили капельно при постоянном помешивании. Клеточную суспензию с концентрацией лейкоцитов 2×10^7 клеток/мл и объемом 0,5 мл охлаждали с помощью программного замораживателя ЗП10 (СКТБ ОП ИПКиК НАН Украины) по 3-этапной программе: I – охлаждение образцов лейкоконцентрата со скоростью 3 град/мин до температуры кристаллизации; II – «температурная остановка» 3–4 мин; III – дальнейшее охлаждение со скоростью 5 град/мин до -100°C , затем контейнеры с клетками помещали в жидкий азот (-196°C).

Отогревали суспензию на водяной бане при 38°C , после чего из одного образца удаляли криопротектор путем медленного разведения отмывочным раствором, в состав которого входили раство-

tration of 7.5% allowed preserving up to $98.29 \pm 0.34\%$ of lymphocytes and $97.15 \pm 1.04\%$ of monocytes. But in this case according to the data of flow cytometry using fluorescent DNA dye 7-AAD the number of viable granulocytes does not exceed $22.22 \pm 1.8\%$, that could be the reason to choose more effective cryoprotectant. An effective cryoprotectant for cells of granulocytic series is dimethyl acetamide (DMAc) [2, 7, 12].

The damages in the granulocytic cells associated with their structural peculiarities are known to appear even under optimal freezing conditions. Therefore the rehabilitation of frozen-thawed leukocytes in the media contributing to restoration of their functional activity is necessary. After incubation of frozen-thawed leukocytes in the medium containing cord blood low-molecular (below 5 kDa) fraction (CBF) a phagocytic activity of neutrophils increased [4].

Research aim was to study the influence of cord blood low-molecular fraction on phagocytic activity of neutrophils frozen-thawed in the presence of 5% DMAc.

Materials and methods

Research object was leukoconcentrate isolated from human donated blood of group A (II) by sedimentation of erythrocytes in dextran solution [5].

Concentrate of leukocytes was cryopreserved under protection of DMAc in final concentration of 5% using slow cooling regimen [2]. Cryoprotective solution contained DMAc, glucose, EDTA Na₂ and purified water was prepared *ex tempore*. Ratio of the volumes of cell suspension and DMAc solution made 3:1 [12]. DMAc solution was added into suspension by drop infusion at constant mixing. Cell suspension with leukocytes concentration of 2×10^7 cells/ml and of 0.5 ml volume was cooled with programmable freezer ZP 10 (Special Designing and Technical Bureau of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) according to 3-step program: I – cooling of leukoconcentrate samples with rate of 3 deg/min down to the crystallization temperature; II – ‘temperature stop’ for 3–4 min; III – further cooling with the rate of 5 deg/min down to -100°C , then containers with cells were placed into liquid nitrogen (-196°C).

The suspension was thawed in water bath at 38°C , afterwards the cryoprotectant was removed out of part of samples by slow dilution with washing solution which contained dextran and albumin (1:1) with the following centrifugation by the method of A.K. Gulevsky [6]. Other samples were studied without washing. Cell survival was assessed with trypan blue staining [13].

Phagocytic activity of neutrophils was investigated according to the method of Rozanova O.E. *et al.* [10]. Object of phagocytosis was the inactivated daily culture

ры декстрана и альбумина (1:1), с последующим центрифугированием по методу Гулевского А.К. и соавт. [6]. Второй образец исследовали без отмывки. Сохранность клеток оценивали с помощью окрашивания трипановым синим [13].

Фагоцитарную активность нейтрофилов исследовали по методу Розановой О.Е. и соавт. [10]. Объект фагоцитоза – инактивированная суточная культура *Staphylococcus aureus* штамм №209 на физиологическом растворе в концентрации 2 млрд микробных тел/мл. Фагоцитарную суспензию инкубировали в воздушном термостате при температуре 37°C в течение 45 и 120 мин. Мазки фиксировали раствором эозин-метиленовым синим по Маю-Грюнвальду, окрашивали раствором азур-эозина по Романовскому. Критериями оценки функциональной полноценности криоконсервированных лейкоцитов были следующие показатели: фагоцитарный индекс (ФИ) – количество фагоцитирующих нейтрофилов; фагоцитарное число (ФЧ) – среднее количество микробных тел на один нейтрофил (после 45 и 120 мин инкубации), характеризующее поглотительную активность фагоцитов; индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) – отношение ФЧ после 45 мин инкубации к ФЧ после 120 мин инкубации, характеризующее процесс переваривания у фагоцитов.

Фракцию с компонентами молекулярной массой до 5 кДа из цельной кордовой крови крупного рогатого скота выделяли методом ультрафильтрации [3] с использованием мембранного модуля «Sartorius» (Германия). После ультрафильтрации ФКК лиофилизировали [8] и затем хранили при –80°C. Через 45 и 120 мин инкубации после добавления ФКК в реабилитирующую среду в количестве 0,15 мг/мл изучали фагоцитарную активность деконсервированных лейкоцитов. При исследовании влияния ФКК на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов в качестве контроля были использованы криоконсервированный лейкоконцентрат без ФКК (К1) и с добавлением физиологического раствора в объеме, эквивалентном ФКК (К2).

Статистический анализ экспериментальных данных проводили при помощи компьютерной обработки с использованием программного пакета «Statgraphics plus» версии 2.1 по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Экспериментальные данные приведены как среднее арифметическое ± среднее квадратическое отклонение. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментальной работы с помощью теста с суправитальным красителем трипановым синим нами был изучен показатель жизнеспособности лейкоцитов, криоконсервированных под за-

of *Staphylococcus aureus* N209 in physiological solution in concentration of 2 billion bacterial bodies/ml. Phagocytic suspension was incubated in thermostated air bath at 37°C during 45 and 120 min. Blood smears were fixed with eosin methylene blue according May-Grunwald, then stained with eosin-methylene blue according Romanovsky method. Assessment criteria of functional capacity of cryopreserved leukocytes were the following indices: phagocytic index (PhI) which is the number of phagocytizing neutrophils; phagocytic number (PhN) being the average number of bacterial bodies per one neutrophil (after 45 and 120 min of incubation) characterizing absorptive activity of phagocytes; and phagocytosis completeness index (PhCI) which is the ratio of PhN after 45-min incubation to PhN after 120-min incubation characterizing the digestion in phagocytes.

Fraction with components of molecular mass below 5 kDa from whole cattle cord blood was isolated by ultrafiltration method [3] using membrane module from Sartorius (Germany). After ultrafiltration the CBF was frozen-dried [8] and then stored at –80°C. In 45 and 120 min of incubation after addition of 0.15 mg/ml CBF in rehabilitation medium the phagocytic activity was studied. Investigation of CBF effect on the indices of neutrophils phagocytic activity utilized as the controls the cryopreserved leukoconcentrate without CBF (C1) and the one supplemented with physiological solution in amount equal to CBF (C2).

Statistical analysis of experimental data was performed by computer processing with software package Statgraphics plus 2.1 by non-parametric criterion of Mann-Whitney. Experimental data were presented as arithmetic mean ± mean square deviation. The differences were assumed as significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Performing the experiments we have assessed viability index of leukocytes cryopreserved under protection of DMAc (5%) using supravital dye trypan blue. Results of investigations showed that this cryoprotectant allowed preserving $79.96 \pm 1.75\%$ of viable cells (Table). Previously [4, 6] we have shown that after leukoconcentrate cryopreservation with 7.5% DMSO this index did not exceed $69.06 \pm 2.63\%$. Further removal of DMAc by described above method slightly decreased the number of viable cells.

It was shown [7] that DMAc has an advantage to allow preserving up to $80 \pm 1.49\%$ of leukocytes in viable state even in comparatively low concentrations (1.5–2.5%) [7]. Moreover, when using DMAc the duration of hyperosmotic stress for cells was less expressed enabling to increase the number of viable granulocytes by 7–10% if compared to the case of 10% DMSO as a cryoprotectant [7]. It is worth noting that in case of DMAc there was no need of long-lasting incubation

щитой ДМАц (5%). Результаты исследований показали, что этот криопротектор позволяет сохранять до $79,96 \pm 1,75\%$ жизнеспособных клеток (таблица). Ранее было показано [4, 6], что после криоконсервирования лейкоконцентрата с 7,5% ДМСО данный показатель не превышал $69,06 \pm 2,63\%$. Дальнейшее удаление ДМАц описанным выше методом незначительно уменьшало количество жизнеспособных клеток.

Одно из преимуществ ДМАц в том, что даже в сравнительно низких концентрациях (1,5–2,5%) он позволяет сохранять в жизнеспособном состоянии до $80 \pm 1,49\%$ лейкоцитов [7]. Кроме того, при использовании ДМАц длительность гиперосмотического стресса для клеток менее выражена, что позволяет увеличить количество жизнеспособных гранулоцитов на 7–10% по сравнению с использованием 10% ДМСО в качестве криопротектора [7]. Следует также отметить, что при применении ДМАц не требуются экспозиция клеток с криозащитным раствором и отмывка образца после размораживания, что уменьшает время воздействия криопротектора на клетки и позволяет сохранить большее количество жизнеспособных гранулоцитов.

Изучение показателей фагоцитоза показало, что в присутствии 5% ДМАц в инкубационной среде имеется тенденция к снижению поглотительной активности нейтрофилов (рис. 1, В). На количество фагоцитирующих нейтрофилов и индекс завершенности фагоцитоза ДМАц в используемой концентрации не оказывал достоверного влияния (рис. 1А, С).

В дальнейших экспериментах нами были изучены показатели фагоцитарной активности нейтрофилов, криоконсервированных под защитой ДМАц (рис. 2). При этом было установлено, что криоконсервирование достоверно снижало количество фагоцитирующих нейтрофилов через 45 и 120 мин инкубации на 29,5 и 28,81% соответственно (рис. 2, А).

Поглотительная активность деконсервированных нейтрофилов (ФЧ) после 45 мин инкубации также достоверно ($p < 0,05$) снижалась на 42,45% по сравнению с контролем (рис. 2, В).

Кроме того, уменьшение фагоцитарной активности отражалось на переваривающей активности (ИЗФ) нейтрофилов, которая снижалась в среднем на 36,92% (рис. 2, С).

Жизнеспособность лейкоцитов до и после криоконсервирования под защитой 5% ДМАц
Viability of leukocytes prior to and after cryopreservation under protection of 5% DMAc

Образец Specimen	Жизнеспособность, % Viability, %
Свежевыделенный лейкоконцентрат Fresh leukoconcentrate n=6	$97,81 \pm 0,42$
Лейкоконцентрат после инкубации с ДМАц Leukoconcentrate after incubation with DMAc n=5	$94,75 \pm 0,78$
Лейкоконцентрат после криоконсервирования с 5% ДМАц Leukoconcentrate after cryopreservation with 5% DMAc n=6	$76,96 \pm 1,75^{* \#}$
Лейкоконцентрат после криоконсервирования с 5% ДМАц и отмывки Leukoconcentrate after cryopreservation with 5% DMAc and washing n=6	$69,82 \pm 1,89^{* \#}$

Примечания: * – отличия достоверны по отношению к свежевыделенному лейкоконцентрату ($p < 0,05$); # – отличия достоверны по отношению к лейкоконцентрату после инкубации с 5% ДМАц в среде ($p < 0,05$).

Notes: * – the differences are significant if compared to the fresh leukoconcentrate ($p < 0.05$); # – differences are significant if compared to the leukoconcentrate after incubation with 5% DMAc in the medium ($p < 0.05$).

of cells with cryoprotective solution and washing of the sample after thawing, that decreased the period of cryoprotectant exposure to cells and allowed to preserve the higher number of viable granulocytes.

Investigation of phagocytosis indices has shown that there was a tendency to the decrease of neutrophils absorptive activity in the presence of 5% DMAc in incubation medium (Fig. 1B). DMAc did not affect significantly the number of phagocytizing neutrophils and phagocytosis completeness index in the used concentration (Fig. 1A, C).

In further experiments we studied the indices of phagocytic activity of neutrophils cryopreserved under protection of DMAc (Fig. 2). We established that cryopreservation had significantly decreased the number of phagocytizing neutrophils after 45 and 120 min incubation by 29.5 and 28.81%, accordingly (Fig. 2A).

Absorptive activity of frozen-thawed neutrophils (PhN) after 45 min incubation also significantly ($p < 0.05$) decreased by 42.45% comparing with the control (Fig. 2B).

Moreover, the decrease of phagocytic activity was reflected in digesting activity (PhCI) of neutrophils which decreased by 36.92% in average (Fig. 2C).

In further experiments there was investigated the possibility of rehabilitation of frozen-thawed neutrophils after incubation in the medium containing cord blood

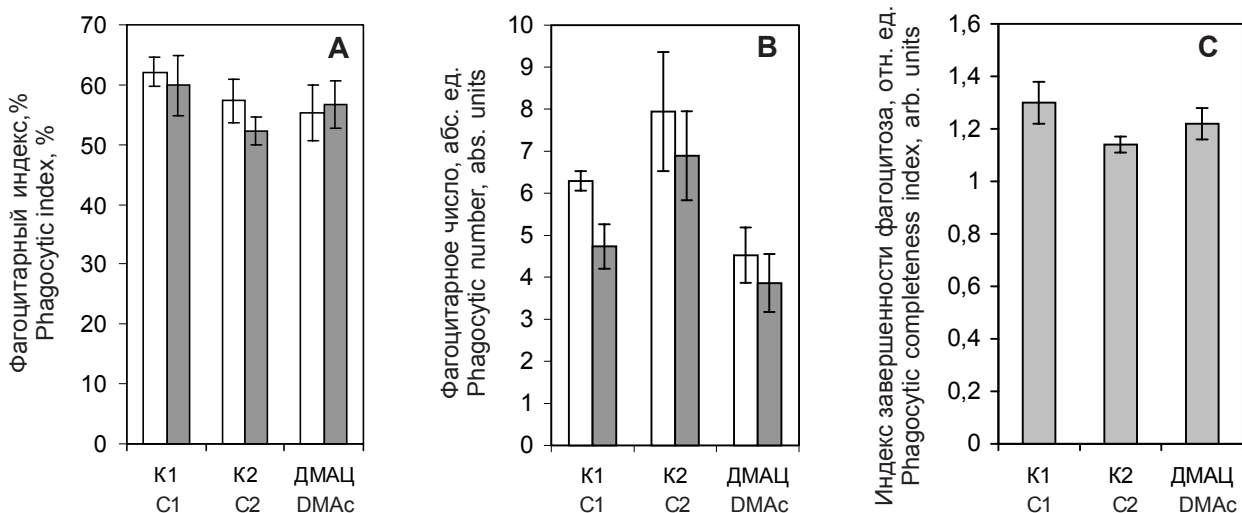


Рис. 1. Влияние инкубации в 5%-м растворе ДМАц на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов лейкоконцентрата донорской крови человека: А – фагоцитарный индекс; В – фагоцитарное число; С – индекс завершенности фагоцитоза (К1 – свежевыделенный лейкоконцентрат и К2 – свежевыделенный лейкоконцентрат с добавлением физиологического раствора); □ – 45 мин инкубации; ■ – 120 мин инкубации.

Fig. 1. Effect of exposure in 5% DMAc solution on indices of phagocytic activity of human donated blood leukoconcentrate neutrophils: А – phagocytic index; В – phagocytic number; С – phagocytosis completeness index (C1 – fresh leukoconcentrate and C2 – fresh leukoconcentrate with physiological solution); □ – 45 min of incubation; ■ – 120 min of incubation.

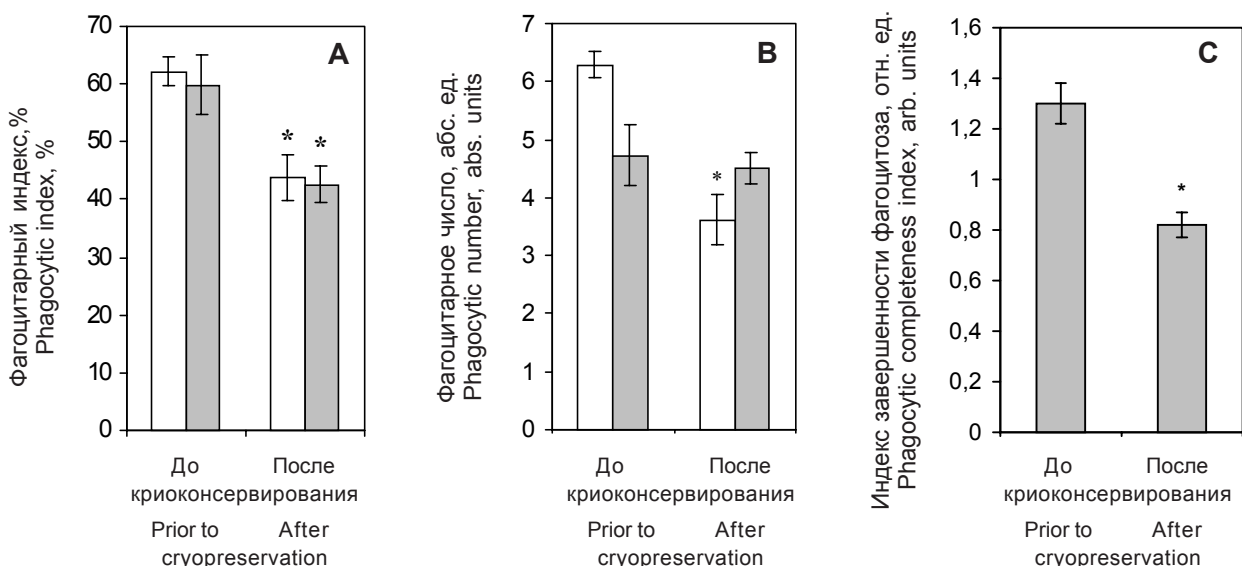


Рис. 2. Влияние криоконсервирования под защитой ДМАц на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов лейкоконцентрата донорской крови человека: А – фагоцитарный индекс; В – фагоцитарное число; С – индекс завершенности фагоцитоза; □ – 45 мин инкубации; ■ – 120 мин инкубации; * – отличия достоверны по сравнению с контролем до криоконсервирования ($p < 0,05$).

Fig. 2. Effect of cryopreservation under DMAc protection on indices of phagocytic activity of human donated blood leukoconcentrate neutrophils: А – phagocytic index; В – phagocytic number; С – phagocytosis completeness index; □ – 45 min of incubation; ■ – 120 min of incubation; * – the differences are significant if compared to the control prior to cryopreservation ($p < 0.05$).

В последующих экспериментах была исследована возможность реабилитации деконсервированных нейтрофилов после инкубации в среде, содержащей низкомолекулярную фракцию кордовой крови (до 5 кДа) в концентрации 0,15 мг/мл. При этом было обнаружено, что ФКК не оказывала достоверного влияния на количество нейтрофилов,

low-molecular fraction (below 5 kDa) in 0.15 mg/ml concentration. Thereat, we noted that CBF did not significantly affect the neutrophils number involved into phagocytic reaction (Fig. 3A) that correlated with our recent data [6].

Analysis of the absorptive activity of frozen-thawed neutrophils revealed other dynamics. Supplementing

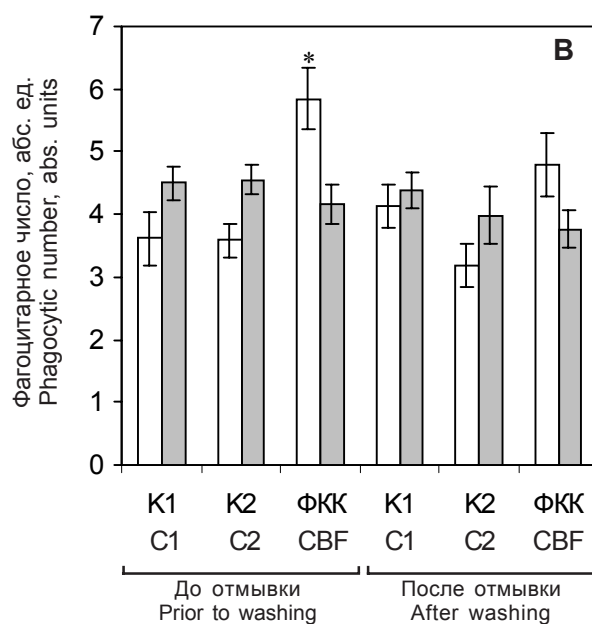
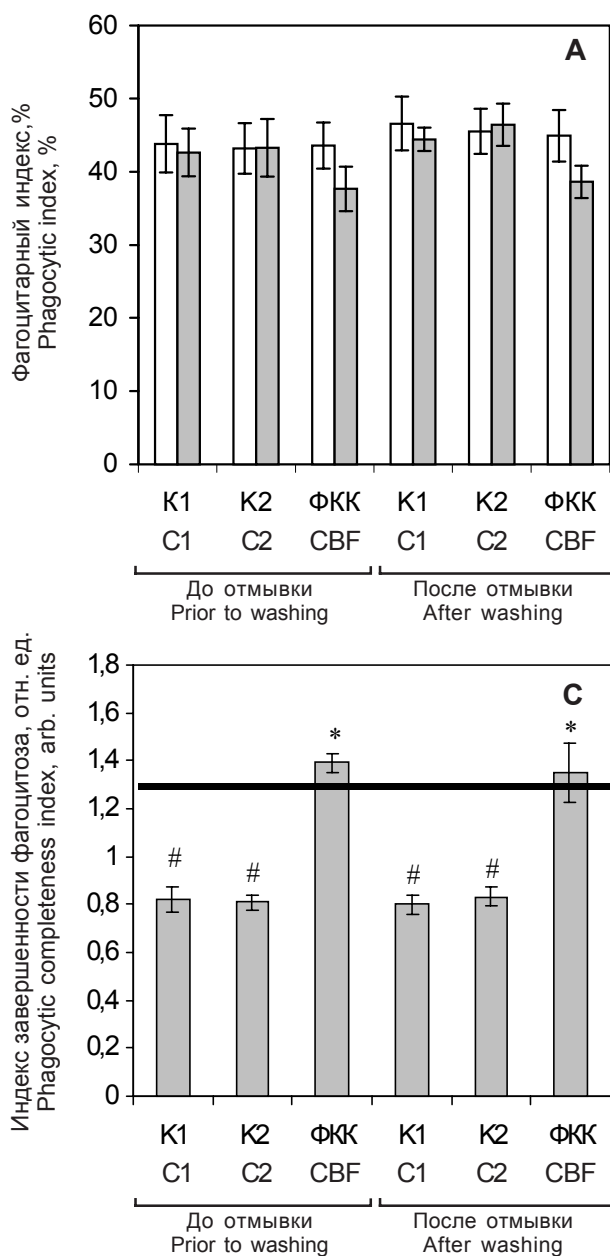


Рис. 3. Влияние ФКК на показатели фагоцитарной активности криоконсервированных нейтрофилов лейкоконцентрата: А – фагоцитарный индекс; В – фагоцитарное число (□ – 45 мин инкубации; ■ – 120 мин инкубации); С – индекс завершенности фагоцитоза (— – у нативных нейтрофилов; К1 – лейкоконцентрат, криоконсервированный с 5% ДМАц; К2 – лейкоконцентрат с заменой ФКК на эквивалентный объем физиологического раствора и криоконсервированный с 5% ДМАц); * – отличия достоверны по сравнению с контролем после криоконсервирования ($p < 0,05$); # – отличия достоверны по сравнению с контролем до криоконсервирования ($p < 0,05$).

Fig. 3. CBF effect on indices of phagocytic activity in cryopreserved leucoconcentrate neutrophils: А – phagocytic index; В – phagocytic number (45 min of incubation; 120 min of incubation); с – phagocytosis completeness index (— – in native neutrophils; C1 – leucoconcentrate cryopreserved with 5% DMAc; C₂ – leucoconcentrate with physiological solution instead equal CBF volume and cryopreserved with 5% DMAc); * – the differences are significant if compared to the control after cryopreservation ($p < 0.05$); # – the differences are significant if compared to the control prior to cryopreservation ($p < 0.05$).

вступивших в фагоцитарную реакцию (рис. 3, А), что согласуется с данными предыдущего исследования [6].

При изучении поглотительной активности деконсервированных нейтрофилов была отмечена совершенно иная динамика. Добавление в среду инкубации ФКК (0,15 мг/мл) способствовало увеличению поглотительной активности нейтрофилов после 45 мин инкубации на 62,67% по сравнению с К1 и К2 (рис. 3, В). При этом показатель ФЧ после 120 мин инкубации в тех же условиях был на уровне контрольных значений. Необходимо отметить тот факт, что после 120 мин инкубации деконсервированных нейтрофилов без добавления ФКК их погло-

the incubation medium with CBF (0.15 mg/ml) contributed to the increase of neutrophils absorptive activity after 45 min incubation by 62.67% if compared with the controls C1 and C2 (Fig. 3B). Herewith, PhN index after 120-min incubation in the same conditions was at the level of the control indices. It is worth noting that after 120 min incubation of frozen-thawed neutrophils without CBF their absorptive activity was higher than after 45 min incubation, that obviously testified to the worsening of microorganisms digestion (Fig. 3B). This suggestion about worsened neutrophils digestive activity was well confirmed by the data of PhCI reflecting the ability of phagocytes to the killing-effect [9]. Completeness of phagocytosis is final index by which

тельная активность была выше, чем после 45 мин инкубации, что, по-видимому, свидетельствует об ухудшении процесса переваривания микроорганизмов (рис. 3, В). Это предположение об ухудшении переваривающей активности нейтрофилов хорошо подтверждается данными изучения ИЗФ, который отражает способность фагоцитов к киллинг-эффекту [9]. Завершенность фагоцитоза является итоговым показателем, по которому можно косвенно судить об эффективности всех предыдущих этапов фагоцитоза – хемотаксисе, адгезии, поглощении, образовании фагосом и переваривании поглощенных микроорганизмов. В наших исследованиях показано, что после криоконсервирования переваривающая активность нейтрофилов достоверно снижалась до $0,82 \pm 0,05$ по сравнению с контролем до криоконсервирования (не менее 1). Добавление в среду инкубации ФКК (0,15 мг/мл) приводило к повышению ИЗФ криоконсервированных нейтрофилов до значений данного показателя для свежеевыделенных клеток ($1,39 \pm 0,04$) (рис. 3, С).

Удаление криопротектора из лейкоконцентрата, подвергнутого криоконсервированию, не оказывало достоверного влияния на все изучаемые показатели фагоцитарной активности лейкоцитов.

Таким образом, на основании проведенных нами исследований было установлено, что использование ДМАц в качестве криопротектора позволяет увеличить количество жизнеспособных лейкоцитов, а также показано, что ФКК в составе реабилитирующей среды оказывает стимулирующее действие на фагоцитарную активность деконсервированных нейтрофилов. Для выяснения механизма действия низкомолекулярной ФКК на процесс фагоцитоза необходимо дальнейшее его изучение.

Выводы

1. Использование в качестве криопротектора 5% ДМАц позволяет увеличить количество жизнеспособных лейкоцитов после замораживания-отогрева до 80%.

2. Установлено, что после добавления в среду инкубации низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови в концентрации 0,15 мг/мл повышается поглотительная активность деконсервированных нейтрофилов на 62,67 %.

3. После инкубации деконсервированных нейтрофилов в среде, содержащей низкомолекулярную фракцию (до 5 кДа) кордовой крови в концентрации 0,15 мг/мл, на 69,51% повышается их переваривающая активность.

4. Показано, что низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) кордовой крови в концентрации 0,15 мг/мл в среде инкубации не оказывает влияния на количество нейтрофилов, вступивших в фагоцитарную реакцию.

one may indirectly evaluate the efficiency of all previous phagocytosis stages, *i. e.* hemotaxis, adhesion, absorption, formation of phagosomes and digestion of absorbed microorganisms. Our research showed that neutrophils digestive activity significantly decreased down to 0.82 ± 0.05 post cryopreservation comparing to the non-frozen-thawed control (not less than 1). Supplementing of incubation medium with CBF (0.15 mg/ml) led to the increase of PhCI of cryopreserved neutrophils up to the values of this index for fresh cells (1.39 ± 0.04) (Fig. 3C).

Cryoprotectant removal out of leukoconcentrate after cryopreservation did not significantly affect all the studied indices of leukocytes phagocytic activity.

Thus basing on the performed investigations we established that using DMAc as a cryoprotectant allowed the increasing of viable leukocytes number post cryopreservation, and that CBF as a component of rehabilitation medium had a stimulatory effect on phagocytic activity of frozen-thawed neutrophils. Further investigation is necessary to elucidate the mechanism of low-molecular CBF action on phagocytosis.

Conclusions

1. Using of 5% DMAc as a cryoprotectant allows to increase the post-thaw number of viable leukocytes up to 80%.

2. We established after supplementing of incubation medium with cord blood low-molecular fraction (below 5kDa) in 0.15 mg/ml concentration the absorptive activity of frozen-thawed neutrophils increased by 62.67%.

3. After incubation of frozen-thawed neutrophils in the medium containing cord blood low-molecular fraction (below 5kDa) in 0.15 mg/ml concentration their digestive activity increases by 69.51%.

4. It has been shown that cord blood low-molecular fraction (below 5kDa) in 0.15 mg/ml concentration as a part of incubation medium does not affect the number of neutrophils involved in phagocytic reactions.

References

1. *Agranenko V.A., Abezgauz N.N., Troshina V.M. et al.* Cryopreservation of granulocytes using 'Leukocryodmac' solution // *Hematologiya i Transfuziologiya*. – 1986. – Vol. XXXI, N12. – P. 26–29.
2. *Balashov D.N.* Therapeutic granulocyte transfusions for treatment of severe infectious complications in patients with neutropenia: Author's abstract of thesis of candidate of medical sciences. – Moscow, 2001. – 23 p.
3. *Brock T.D.* Membrane filtration. – Moscow: Mir, 1987. – 464 p.
4. *Gorina O.L.* Rehabilitation of cryopreserved leukocytes in medium containing cord blood low-molecular fraction: Author's abstract of candidate of biological sciences. – Kharkov, 2011. – 143 p.
5. *Grishina V.V., Timokhina E.V., Andreeva L. Yu.* System of collecting and fractioning of umbilical blood stem cells // *Voprosy Ginekologii, Akusherstva i Perinatologii*. – 2004. – Vol. 3, N6. – P. 50–54.

Литература

1. Аграненко В.А., Абезгауз Н.Н., Трошина В.М. и др. Криоконсервирование гранулоцитов с раствором «Лейкокриодмац» // Гематология и трансфузиология. – 1986. – Т. XXXI, №12. – С. 26–29.
2. Балашов Д.Н. Лечебные трансфузии гранулоцитов для лечения тяжелых инфекционных осложнений у пациентов с нейтропенией: Автореф. дис. ...канд.мед. наук. – М., 2001. – 23 с.
3. Брок Т.Д. Мембранная фильтрация. – М.: Мир, 1987. – 464 с.
4. Горина О.Л. Реабилитация криоконсервированных лейкоцитов в среде, содержащей низкомолекулярную фракцию кордовой крови: Дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 2011. – 143 с.
5. Гришина В.В., Тимохина Е.В., Андреева Л.Ю. Система сбора и фракционирования стволовых клеток пуповинной крови // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2004. – Т. 3, №6. – С. 50–54.
6. Гулевский А.К., Горина О.Л., Моисеева Н.Н., Степанюк Л.В. Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови и Actovegin на фагоцитарную активность деконсервированных лейкоцитов // Укр. журнал гематології та трансфузіології. – 2010. – №1. – С. 22–29.
7. Леонтович В.А., Абезгауз Н.Н., Трошина В.М. Метод замораживания гранулоцитов с диметилацетамидом // Современные проблемы криобиологии и криомедицины. – М., 1975. – С. 77–84.
8. *Медичні імунобіологічні препарати: Методичні рекомендації щодо викладення технологічних регламентів на препарати крові* [Настанова з якості 42-3002-011-2005]. – Київ, МОЗ України [Наказ МОЗ України № 376 від 26.07.2005]. – 144 с.
9. Пинегин Б.В., Маянский Н.А. Нейтрофилы: структура и функция // Иммунология. – 2007. – №6. – С. 374–382.
10. Розанова О.Е., Серова Л.Д., Шабалин В.Н. Влияние цитостатических и гормональных препаратов на фагоцитарную активность нейтрофилов больных лейкозом // Гематология и трансфузиология. – 1989. – №4. – С. 15–20.
11. Сведенцов Е.П., Щеглова О.О., Туманова Т.В. и др. Сохранность лейкоцитов в условиях криоанабиоза (–40°C) // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2006. – Vol. 2, №1. – P. 29–34.
12. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др. Криоконсервирование клеточных суспензий. – Киев: Наук.думка, 1983. – 240 с.
13. Kusaba N., Kumashiro R., Ogata H. et al. In vitro study of neutrophil apoptosis in liver cirrhosis // Intern. Med. – 1998. – Vol. 37, №1. – P. 11–17.
6. Gulevsky A.K., Gorina O.L., Moiseeva N.N., Stepanyuk L.V. Stimulating effect of cord blood low-molecular fraction (below 5 kDa) and Actovegin on phagocytic activity of frozen-thawed leukocytes // Ukrainskiy Zhurnal Gematologii i Transfuziologii. – 2010. – N1. – P. 22–29.
7. Leontovich V.A., Abezgauz N.N., Troshina V.M. Use of dimethyl acetamide as a cryoprotective agent in granulocyte freezing // Current Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – Moscow, 1975. – P. 77–84.
8. *Medical immunobiological preparations: Methodical recommendations for presentation of technical regulations for blood preparations* [Quality instruction of 42-3002-011-2005]. – Kyiv, Ministry of Health Care of Ukraine [Order of the Ministry of Health Care of Ukraine N376 dated of 26.07.2005]. – 144 p.
9. Pinegin B.V., Mayansky A.N. Neutrophils: structure and function // Immunologiya. – 2007. – N6. – P. 374–382.
10. Rozanova O.E., Serova L.D., Shabalin V.N. Effect of cytostatic and hormonal drugs on the phagocytic activity of neutrophils of leukemia patients // Gematologiya i Transfuziologiya. – 1989. – N4. – P. 15–20.
11. Svedentsov E.P., Shcheglova O.O., Tumanova T.V. et al. Preservation of leukocytes in conditions of cryoanabiosis (–40°C) // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2006. – Vol. 2, N1. – P. 29–34.
12. Tsutsaeva A.A., Agranenko V.A., Fedorova L.I. et al. Cryopreservation of cell suspensions. – Kiev: Naukova Dumka, 1983. – 240 p.
13. Kusaba N., Kumashiro R., Ogata H. et al. In vitro study of neutrophil apoptosis in liver cirrhosis // Intern. Med. – 1998. – Vol. 37, N1. – P. 11–17

Accepted 06.03.2012

Поступила 06.03.2012