

УДК 615.014.41:612.649.011.87:576.31

О.Ю. Кожина\*, М.В. Останков, И.Г. Гриша, Н.А. Бондарович

## Влияние криоконсервирования по двухэтапной программе в растворе высокомолекулярного декстрана на цитоморфологические и функциональные свойства клеток кордовой крови человека

UDC 615.014.41:612.649.011.87:576.31

O.Yu. Kozhina\*, M.V. Ostankov, I.G. Grisha, N.A. Bondarovich

### Effect of Cryopreservation According Two-Stage Program in High-Molecular Dextran Solutions on Cytomorphological and Functional Properties of Human Cord Blood Cells

**Реферат.** Кордовая кровь человека (ККЧ) является признанным источником стволовых клеток и биологически активных веществ. Длительное хранение этого уникального биоматериала возможно в условиях низкотемпературного банка. В данной работе исследовали влияние криоконсервирования по двухэтапной программе замораживания на цитоморфологические и функциональные характеристики клеток лейкоконцентрата ККЧ (ЛККЧ). Показано, что после криоконсервирования под защитой высокомолекулярного декстрана происходит перераспределение в клеточном составе ЛККЧ за счёт снижения содержания гранулоцитов, увеличения количества недифференцированных клеток и макрофагов. Достаточно высокую устойчивость к воздействию факторов криоконсервирования имели стволовые и ранние клетки-предшественники. Отмечали снижение общей бактерицидной активности клеток ЛККЧ и повышение фагоцитарной активности макрофагов.

**Ключевые слова:** кордовая кровь человека, ядродержащие клетки, криоконсервирование, высокомолекулярный декстран, двухэтапное замораживание.

**Реферат.** Кордова кров людини (ККЛ) є визнаним джерелом стовбурових клітин і біологічно активних речовин. Тривале зберігання цього унікального біоматеріала можливо в умовах низькотемпературного банку. У даній роботі досліджували вплив криоконсервування по двохетапній програмі заморожування на цитоморфологічні й функціональні характеристики клітин лейкоконцентрату ККЛ (ЛККЛ). Показано, що після криоконсервування під захистом високомолекулярного декстрану відбувається перерозподіл у клітинному складі ЛККЛ за рахунок зниження вмісту гранулоцитів, збільшення кількості недиференційованих клітин і макрофагів. Досить високу стійкість до впливу факторів криоконсервування мали стовбурові і ранні клітини-попередники. Відзначали зниження загальної бактерицидної активності клітин ЛККЛ і підвищення фагоцитарної активності макрофагів.

**Ключові слова:** кордова кров людини, ядровмісні клітини, криоконсервування, високомолекулярний декстран, двохетапне заморожування.

**Abstract.** Human cord blood (HCB) is a conventional source of stem cells and biologically active substances. Long-term storage of this unique biomaterial is possible under conditions of low temperature bank. In this research we studied the effect of cryopreservation according to two-stage freezing program on cytomorphological and functional characteristics of cells of HCB leukoconcentrate (HCBL). It was shown that after cryopreservation under protection of high molecular dextran, redistribution in cell composition of HCBL occurred due to reduction of granulocytes population, increase of non-differentiated cells and macrophages number. Quite a high resistance to effect of cryopreservation factors had stem and early progenitor cells. There was noted a reduction of total bactericidal activity of HCBL cells and increase of phagocytic activity of macrophages.

**Key words:** human cord blood, nucleated cells of blood, cryopreservation, high-molecular dextran, two stage freezing.

В настоящее время в мире ведется активная научно-исследовательская работа по изучению свойств и характеристик клеток кордовой крови человека (ККЧ) [5, 6, 19, 20]. Благодаря многокомпонентному клеточному составу суспензии ККЧ, наличию в ней комплекса биологически активных

Nowadays the scientists in the world actively study the properties and characteristics of cells of human cord blood (HCB) [5, 6, 19, 20]. Due to multicomponent cell composition of HCB suspension, the presence of the complex of biologically active compounds in it [3, 4], providing the growth and maturation of tissues and

Отдел криопатофизиологии и иммунологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;  
тел.: (+38 057) 373-57-89, факс: (+38 057) 373-30-84,  
электронная почта: dr\_yalo@mail.ru

\* To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 373 5789, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: dr\_yalo@mail.ru

Поступила 27.11.2012  
Принята в печать 30.01.2013

Received November, 27, 2012  
Accepted January, 30, 2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №1. – С. 58–65.  
© 2013, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 1. – P. 58–65.  
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

соединений [3, 4], обеспечивающих рост и созревание тканей и органов плода [4], расширяется спектр показаний для клинического применения ККЧ [3, 5, 12].

Для длительного хранения ККЧ и последующего использования в медицинской практике необходимо создать низкотемпературный банк, в котором биоматериал будет содержаться при температуре жидкого азота [13, 18]. По мнению ряда ученых и врачей, создание запасов пуповинной крови должно стать одним из приоритетных направлений развития здравоохранения на ближайшие годы [8, 16].

В ИПКиК НАН Украины был разработан и запатентован способ получения лейкоконцентрата ККЧ (ЛККЧ) в аутологичной плазме с последующим его криоконсервированием без использования традиционных криопротекторов [17]. Условиями успешного применения криоконсервированного ЛККЧ (кЛККЧ) являются высокая сохранность и функциональная полноценность биоматериала после замораживания-отогрева и низкотемпературного хранения.

Наиболее доступный метод оценки клеточного спектра ЛККЧ с помощью световой микроскопии даёт лишь общую информацию о составе суспензии, но не позволяет однозначно судить о содержании отдельных субпопуляций. Использование же современных возможностей проточной цитофлуориметрии обеспечивает точность и полноту определения клеточного состава ЛККЧ. Поэтому проведение сравнительного анализа морфологических, иммунофенотипических и функциональных характеристик клеток ЛККЧ до и после криоконсервирования позволит дать более полную оценку модифицирующего влияния низких температур на клетки кордовой крови человека.

Цель работы – изучение морфологических, иммунофенотипических и функциональных свойств клеток ЛККЧ до и после криоконсервирования, оценка их сохранности после замораживания-отогрева.

### Материалы и методы

Объектом исследования была ККЧ, которую получали из материнского конца пуповины после ее отделения при доношенной беременности у здоровых рожениц после подписания с ними информированного согласия. Кровь отбирали в стерильные флаконы с добавлением антикоагулянта СРД (цитрат-фосфат-декстрозный раствор) с соблюдением правил асептики и антисептики [13]. Из ККЧ получали лейкоконцентрат в аутоплазме методом седиментации эритроцитов [13].

Лейкоконцентрат ККЧ замораживали в одноразовых пластиковых криопробирках («Nunc», США) по двухэтапной программе в растворе вы-

organs of fetus [4], the HCB could be applied in clinic for more broad spectrum of indications [3, 5, 12].

Long-term storage of HCB and the following application in medical practice requires to establish low-temperature banks, wherein the biospecimens will be stored at liquid nitrogen temperature [13, 18]. Several scientists and physicians believe the storage of umbilical blood will be one of the promising trends for healthcare development for the next few years [8, 16].

At the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine there was developed and patented the method of HCB leukoconcentrate (HCBL) procurement in autological plasma and following cryopreservation without the usage of traditional cryoprotectants [17]. A high integrity and full functional value of the biospecimen after freeze-thawing and low-temperature storage are *sine qua non* conditions for successful application of cryopreserved HCBL (cHCBL).

The most available method of assessment of HCBL cell spectrum using light microscopy provides only general information about suspension composition, but does not allow to judge unequivocally about the content of certain subpopulations. Using of contemporary resources of flow cytometry provides an accuracy and completeness of determination of HCBL cell composition. Therefore, a comparative analysis of morphological, immunophenotypic and functional characteristics of HCBL cells prior to and after cryopreservation could provide an overall estimation of modifying effect of low temperatures on cells of human cord blood.

The research aim was to study morphological, immunophenotypic and functional characteristics of HCBL cells prior to and after cryopreservation, as well as to assess their integrity after freeze-thawing.

### Materials and methods

The research object was HCB, derived from upper external extremity after its separation after a full-term pregnancy of maternity patients after their informed consent. Blood was collected into sterile flasks containing the anticoagulant CPD (citrate-phosphate-dextrose solution) complying the aseptic and antiseptic regularities [13]. Leukoconcentrate in autoplasm was obtained from HCB by sedimentation of erythrocytes [13].

Leukoconcentrate of HCB was frozen in disposable plastic cryotubes (Nunc, USA) according two-stage program in solution of a high molecular dextran (Polyglucin, Yuriya-Farm, Ukraine) [17]. The samples of cryopreserved HCBL (cHCBL) were stored at low-temperature bank of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine. Suspension was thawed in water bath at 40...41°C [4].

Quantity of nucleated cells of HCBL prior to and after cryopreservation was calculated in Goryaev's



сокомолекулярного декстрана («Полиглюкин», «Юрия-Фарм», Украина) [17]. Образцы криоконсервированного ЛККЧ (кЛККЧ) хранили в низкотемпературном банке ИПКиК НАН Украины. Суспензию кЛККЧ отогревали на водяной бане при температуре 40...41°C [4].

Количество ядродержащих клеток ЛККЧ до и после криоконсервирования подсчитывали в камере Горяева по общепринятой методике [9]. До криоконсервирования и в первые 5 мин после отогрева клеток ЛККЧ определяли их сохранность экспресс-методом суправитального окрашивания трипановым синим [9] и по включению флуоресцентного красителя пропидиум йодида [1]. Популяционный состав ЛККЧ исследовали методом проточной цитофлуориметрии («FACS Calibur», «BD Biosciences», США) и программы Win MDI с использованием моноклональных антител к молекулам CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD34, CD56 («BD», США). Клеточный состав ЛККЧ до и после криоконсервирования оценивали на мазках, окрашенных азур-II-эозином по Романовскому под световым микроскопом («BIOLAR», Польша) ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$  и  $\times 90$  (масляная иммерсия).

Функциональную активность клеток ЛККЧ до и после криоконсервирования определяли после их осаждения центрифугированием при 200g и температуре 20°C в течение 40 мин, надосадок удаляли, клетки ресуспендировали в стерильном ринггер-фосфатном буфере [15] до необходимой концентрации.

Оценку фагоцитарной активности моноцитов и макрофагов ЛККЧ проводили после инкубации с убитой культурой стафилококка *S. aureus* в соотношении 1:2 под световым микроскопом ЛОМО; ок.  $\times 10$ , об.  $\times 90$  (масляная иммерсия). Определяли фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ) и абсолютный показатель фагоцитарной активности (АПФА) [2].

Метаболическую активность клеток ЛККЧ оценивали в НСТ-тесте [23]. Окислительно-восстановительную реакцию, т. е. внутриклеточное накопление  $H_2O_2$  (одна из главных бактерицидных субстанций), определяли по количеству темносиних гранул внутриклеточного диформаза в световом микроскопе ЛОМО; ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$  и  $\times 90$  (масляная иммерсия) [9].

Критерием активности протеолитических ферментов ЛККЧ, участвующих в фагоцитозе, была концентрация клеток, в которых выявляли неспецифическую эстеразу (НЭ) и кислую фосфатазу (КФ) [24]. О степени накопления в лизосомах КФ судили по количеству мелких гранул синего цвета, а НЭ – по количеству гранул темно-фиолетового цвета.

chamber according to the standard method [9]. Integrity of HCBL cells was determined prior to cryopreservation in the first 5 min after freeze-thawing by the express-method of supravital staining with Trypan blue [9] and inclusion of fluorescent dye Propidium iodide [1]. Population composition of HCBL was investigated by flow cytofluorimetry (FACS Calibur, BD Biosciences, USA) and Win MDI software using monoclonal antibodies to molecules CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD34, CD56 (BD, USA). Cell composition of HCBL prior to and after cryopreservation was estimated in the smears, stained with azur-II-eosin according to Romanovsky, using light microscope (BIOLAR, Poland) ocular  $\times 10$  and objectives  $\times 40$ ,  $\times 90$  (oil immersion).

Functional activity of HCBL cells prior to and after cryopreservation was determined after their sedimentation by centrifugation at 200g and 20°C for 40 min, supernatant was removed, the cells were resuspended in sterile Ringer-phosphate buffer [15] to the required concentration.

Phagocyte activity of monocytes and macrophages of LHCBL was assessed after incubation with killed culture of *S. aureus* staphylococcus, mixed with the LHCBL in 1:2 ratio. Assessment was performed with light microscope LOMO (Russia) equipped with ocular  $\times 10$  and objective  $\times 90$  (oil immersion). The following indices were derived phagocytic index (PI), phagocytic number (PN) and absolute index of phagocytic activity (AIPA) [2].

Metabolic activity of HCBL cells was assessed with NBT-test [23]. Redox reaction, *i. e.* intracellular accumulation of  $H_2O_2$  (one of the basic bactericide substances) was determined by a number of dark-blue granules of intracellular diformazan using light microscope LOMO; ocular  $\times 10$  and objectives  $\times 40$ , and  $\times 90$  (oil immersion) [9].

The activity of proteolytic enzymes in HCBL participating in phagocytosis was estimated by the concentration of cells with presence of non-specific esterase (NE) and acid phosphatase (AP) [24]. Rate of AP accumulation was determined by number of fine blue granules and for NE it was done by number of dark-violet granules.

The obtained results were statistically processed by Student-Fisher method. Statistical differences were assessed with t-criterion with 5% significance value [7].

## Results and discussion

After cryopreservation the number of cells in HCBL did not significantly differ if compared with non-frozen samples (Fig. 1). Integrity of HCBL cells assessed by express-method of supravital staining with Trypan blue made  $98 \pm 0.9$  and  $84 \pm 5.1\%$  prior to and after freeze-thawing, correspondingly. This method



Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента с учетом коэффициента Фишера. Достоверность отличий оценивали с помощью t-критерия с уровнем значимости 5% [7].

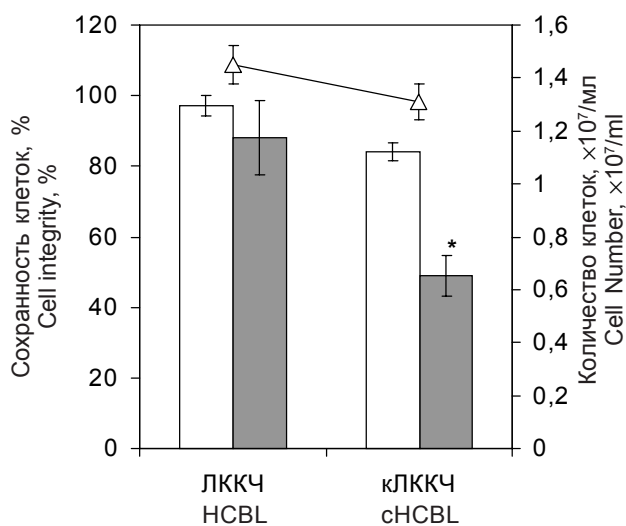
### Результаты и обсуждение

После криоконсервирования количество клеток в ЛККЧ достоверно не изменилось в сравнении с незамороженными образцами (рис. 1). Сохранность клеток ЛККЧ, оцененная экспресс-методом суправитального окрашивания трипановым синим, составляла  $98 \pm 0,9$  и  $84 \pm 5,1\%$  до и после криоконсервирования соответственно. Данный метод позволяет лишь приблизительно оценить жизнеспособность клеток в суспензии, указывая на выраженность нарушений целостности плазматической мембраны клеток. Кроме того, трипановый синий обладает высоким сродством к растворенным белкам (например, к белкам сыворотки ККЧ), что может снижать точность оценки [1].

Более точную информацию о сохранности клеток кЛККЧ даёт метод исключения флуоресцентного красителя пропидиум йодида (PI), проникающего в клетку через повреждённую плазмолемму и связывающегося с ДНК [22]. Соотношение PI-негативных (с интактной мембраной, которые не включают PI) и PI-позитивных клеток в образцах ЛККЧ после криоконсервирования было примерно 1:1 (рис. 1). Следует отметить, что в показателях сохранности клеток кЛККЧ наблюдали большой разброс между образцами, что можно объяснить неоднородностью суспензии ЛККЧ, а также разной чувствительностью клеточных популяций ЛККЧ к физико-химическим факторам криоконсервирования [10].

При анализе клеточного спектра свежевыделенного ЛККЧ до криоконсервирования было отмечено, что во всех исследуемых образцах преобладали гранулоциты. Моноциты и макрофаги составляли небольшой процент, присутствовали недифференцированные крупные клетки (рис. 2). После криоконсервирования в клеточной суспензии ЛККЧ преобладали лимфоциты. Наблюдали относительное снижение количества гранулоцитов и повышение макрофагов и недифференцированных клеток, появлялись фибробластоподобные клетки, отсутствовавшие до замораживания-отогрева. Такого рода перераспределение в клеточных популяциях в кЛККЧ можно объяснить их разной криочувствительностью.

Исследование фенотипических характеристик ЛККЧ после криоконсервирования в общей суспензии выявило относительное повышение количества клеток  $CD4^+$  и снижение  $CD8^+$ , а также рост содержания  $CD56^+$ -клеток на 24% по сравнению с



**Рис. 1.** Количество ЯСК и их сохранность до и после криоконсервирования: □ – сохранность ЯСК по окраске трипановым синим; ■ – сохранность по исключению PI;  $\Delta$  – количество клеток; \* – достоверно значимые различия по сравнению с ЛККЧ ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Number of nucleated cells and their integrity prior to and after cryopreservation.; □ – integrity of nucleated cells by Trypan blue staining; ■ – integrity by exclusion of PI;  $\Delta$  – cell number; \* – differences are significant if compared with HCBL ( $p < 0.05$ ).

enables only approximate estimation of a cell viability in suspension pointing to manifestation of impaired integrity of cell plasmatic membrane. Moreover, trypan blue has a high affinity for dissolved proteins (for example, HCB serum proteins), and this also could reduce the accuracy of estimations [1].

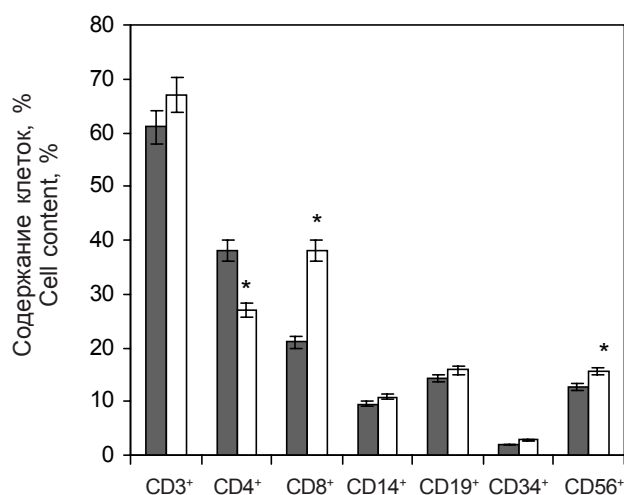
The method of exclusion of fluorescent dye propidium iodide (PI), penetrating in the cell through damaged plasmolemma and binding with DNA [22], provides more accurate information about сHCBL cell integrity. The ratio of PI-negative (with intact membrane, not including PI) and PI-positive cells in the samples of HCBL after cryopreservation was nearly 1:1 (Fig. 1). It should be noted that the indices of сHCBL cell integrity had a wide scatter, stipulated by inhomogeneity of HCBL suspension, as well as various sensitivity of HCBL cell populations to physical and chemical factors of freeze-thawing [10].

Analysis of the cell spectrum of fresh (non-frozen-thawed) HCBL revealed, that all the studied samples had the prevailed granulocyte population. Monocytes and macrophages were in a low percentage, several non-differentiated large cells were present (Fig. 2). Freeze-thawing resulted in a prevailance of lymphocytes in the сHCBL cell suspension. A relative reduction of granulocytes number and the increasing of macrophages and non-differentiated cells content were observed. We revealed the fibroblastoids, which were

незамороженными образцами, что свидетельствует об относительном повышении после замораживания-отогрева количества клеток, обладающих естественной киллерной активностью. Количество CD34<sup>+</sup>-клеток в кЛККЧ достоверно не изменялось (рис. 3).

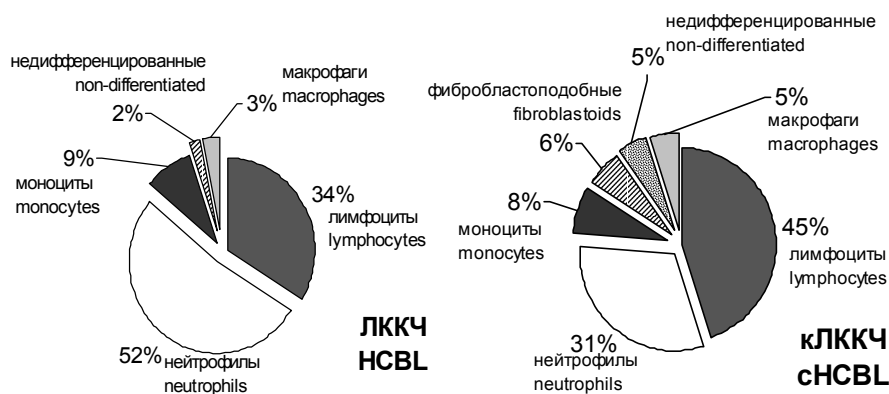
При исследовании функциональной активности клеток ЛККЧ после криоконсервирования отмечали снижение количества НСТ- и НЭ-положительных клеток в 2,5 и 1,8 раза соответственно по сравнению с исходными образцами; относительное же количество клеток, в лизосомах которых КФ положительно реагировала на субстрат, достоверно не изменялось (рис. 4).

Фагоцитарная активность моноцитов после криоконсервирования ЛККЧ снижалась и составляла: ФИ – 54 и ФЧ – 57% по сравнению с показателями нативных образцов (рис. 5). Абсолютный показатель фагоцитарной активности снижался на 26%. При исследовании фагоцитарной активности макрофагов было отмечено, что хотя их относительное количество после криоконсервирования и повысилось, что составило 150,5% от нативного контроля, их фагоцитарная активность снижалась



**Рис. 3.** Популяционный состав ЛККЧ до и после криоконсервирования: ■ – ЛККЧ, □ – кЛККЧ; \* – достоверно значимые различия по сравнению с ЛККЧ ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 3.** Population composition of HCBL prior to and after cryopreservation: ■ – HCBL, □ – cHCBL; \* – differences are significant if compared with HCBL ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 2.** Клеточный состав ЛККЧ до и после криоконсервирования.  
**Fig. 2.** Cell composition of HCBL prior to and after cryopreservation.

not present in the suspension prior to freeze-thawing. Such a redistribution in cHCBL cell populations could be stipulated by their various cryosensitivity.

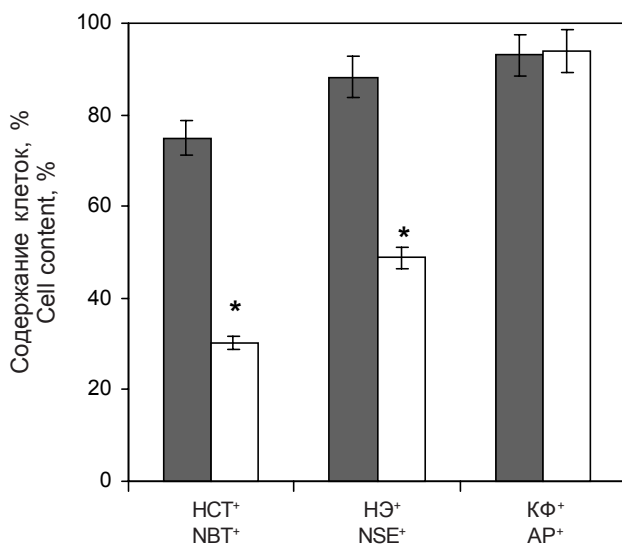
Assessing the HCBL phenotypic characteristics after freeze-thawing revealed that in total suspension a relative increase of CD4<sup>+</sup> cell number occurred as well as decrease of CD8<sup>+</sup> cell number. An increase of CD56<sup>+</sup> cell content by 24% was found if compared with non-frozen-thawed samples, testifying to relative increase of the post-thaw number of cells possessing natural killer activity. The number of CD34<sup>+</sup> cells in cHCBL did not significantly change (Fig. 3).

Investigation of post-thaw functional activity of HCBL cells revealed the reduction of NBT- and NE-positive cells in 2.5 and 1.8 times, correspondingly, if compared with the initial samples. Herewith a relative number of cells, where the lysosome AP positively responded to substrate, did not significantly change (Fig. 4).

Post-thaw activity of monocytes decreased: PI and PN were 54 and 57%, correspondingly, if compared with the indices of non-frozen-thawed samples (Fig. 5). Absolute index of phagocytic activity (AIPA) was decreased by 26%. Analysis of macrophage phagocyte activity revealed that although their post-thaw relative content increased, and made 150.5% of non-frozen-thawed control, their phagocytic activity reduced: PI by 12.3% and PN by 12.5%. However AIPA of macrophages was higher, than of monocytes and by 30% higher relatively to non-frozen-thawed control (Fig. 5).

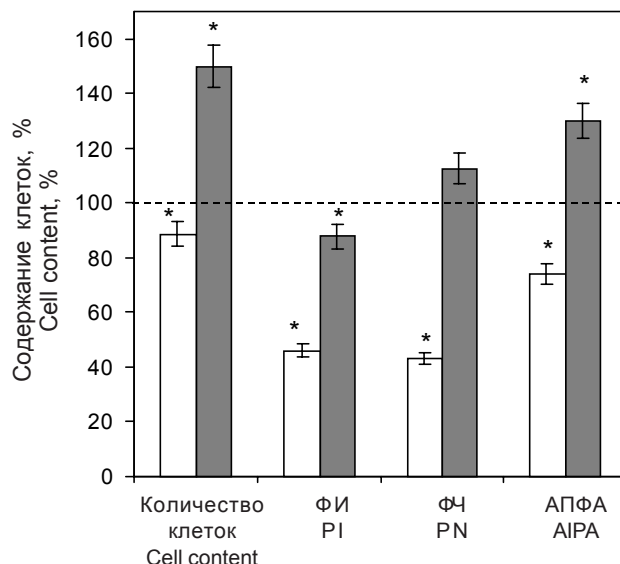
Assessment of populations in HCBL prior to and after freeze-thawing revealed different level of cryosensitivity of cell subpopulations in suspension. After freeze-thawing of HCBL we observed quite a high resistance to freeze-thawing effect possessed by stem and early progenitor cells (CD34<sup>+</sup> cells) [14, 15]. The obtained results have been confirmed by other authors [11], reported an inverse relation between a level of





**Рис. 4.** Гистохимические показатели активности ЯСК ЛККЧ до и после криоконсервирования: ■ – ЛККЧ; □ – кЛККЧ; \* – достоверно значимые различия по сравнению с ЛККЧ ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 4.** Histochemical indices of activity of nucleated cells of HCBL prior to and after cryopreservation: ■ – HCBL; □ – cHLKКЧ; \* – differences are significant if compared with HCBL ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 5.** Показатели фагоцитарной активности моноцитов (□) и макрофагов (■) ЛККЧ после криоконсервирования; за 100% приняты показатели ЛККЧ до криоконсервирования; \* – достоверно значимые различия по сравнению с ЛККЧ ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 5.** Indices of phagocyte activity of monocytes (□) and macrophages (■) of HCBL prior to and after cryopreservation; \* – differences are significant if compared with HCBL ( $p < 0.05$ ).

(ФИ на 12,3, ФЧ на 12,5%). Однако АПФА макрофагов был выше, чем моноцитов, и на 30% выше относительно нативного контроля (рис. 5).

Оценка популяционного состава ЛККЧ до и после замораживания-отогрева выявила различную степень криочувствительности клеточных субпопуляций в суспензии. После криоконсервирования ЛККЧ наблюдали достаточно высокую устойчивость к воздействию факторов криоконсервирования стволовых и ранних клеток-предшественников (CD34<sup>+</sup>-клеток) [14, 15]. Полученные результаты подтверждают и другие авторы [11], показавшие обратную зависимость между степенью дифференцировки клеток и их криоустойчивостью, что поясняют разным ядерно-цитоплазматическим соотношением, скоростью синтеза белков теплового шока, обратимостью или необратимостью денатурации внутриклеточных белков.

Сравнивая данные, полученные при морфологическом и иммунофенотипическом анализе клеточных популяций ЛККЧ, можно сказать, что морфологически одинаковые клетки несут на себе разные поверхностные маркеры, что подтверждает их разную классовую принадлежность и обуславливает различную функциональную активность.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что клеточные популяции ЛККЧ моноцитов и макрофагов в разной степени

cell differentiation and their cryoresistance, which was explained by different nuclei-cytoplasmic ratio, thermal shock protein synthesis rate, reversibility and irreversibility of denaturation of intracellular proteins.

Comparing the data, obtained during morphological and immunophenotypic analysis of HCBL cell populations, we may conclude that morphologically similar cells have different surface markers, confirming they are accessors of different cell classes and possess various functional activity.

Thus, the obtained results testify to the fact that monocyte and macrophage populations of HCBL cells are sensitive to freeze-thawing factors, but in different degree. After freeze-thawing the modification of functional activity of HCBL cells occurs. There is observed a relatively increased content of non-differentiated cells and macrophages due to a high cryosensitivity of granulocytes. The obtained results support the possibility of cryopreservation to modify structural and functional properties of the biospecimen undergoing freeze-thawing [21].

## Conclusions

1. Cryopreservation according two-stage program in solution of high-molecular dextran results in the redistribution in HCBL cell composition due to reducing of granulocytes content and increasing of non-differentiated cells and the macrophage content.

чувствительны к факторам криоконсервирования. После замораживания-оттаивания происходит модификация функциональной активности клеток ЛККЧ. Наблюдается относительное повышение содержания недифференцированных клеток и макрофагов за счет высокой криочувствительности гранулоцитов. Полученные результаты подтверждают возможность криоконсервирования модифицировать структурно-функциональные свойства замораживаемого биообъекта [21].

### Выводы

1. После криоконсервирования по двухэтапной программе в растворе полиглобулина происходит перераспределение в клеточном составе ЛККЧ за счёт снижения содержания гранулоцитов, увеличения количества недифференцированных клеток и макрофагов.

2. После криоконсервирования на фоне снижения общей бактерицидной активности (НСТ и НЭ) клеток ЛККЧ повышается фагоцитарная активность макрофагов.

### Литература

1. Актуальные проблемы патофизиологии: избранные лекции. Учебное пособие для студентов медицинских ВУЗов / Под ред. акад. РАМН Б.Б.Мороза. – М.: Медицина, 2001. – 424 с.
2. Александров М.Г., Кудрявицкий А.И., Румянцева Е.Г. и др. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лабораторное дело. – 1988. – №9. – С. 30–32.
3. Бойко В.В., Грищенко В.И., Криворучко И.А. и др. Применение кордовой крови у больных с желудочными кровотечениями язвенного генеза // Укр. журнал малоінвазивної та ендоскопічної хірургії. – 2001. – №5(1). – С. 11–12.
4. Гольцев А.Н., Калинин Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 2. Иммунологическая характеристика // Проблемы криобиологии. – 1998. – №1. – С. 3–24.
5. Гольцев К.А., Криворучко И.А., Ачигбесов К.А. и др. Применение криоконсервированной кордовой крови в комплексной терапии острого гнойного перитонита у крыс // Медицина сегодня и завтра. – 2011. – №1–2 (50–51). – С. 24–30.
6. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Модификация состояния лимфогемопоэтического комплекса организма в условиях применения продуктов фетоплацентарного комплекса // Трансплантология. – 2001. – №3. – С. 5.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 293 с.
8. Лобынцева Г.С. Теоретические вопросы криоконсервирования стволовых клеток. Особенности работы криобанка пуповинной крови // Трансплантология. – 2007. – Т. 3, №1. – С. 104.
9. Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.А. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 543 с.
10. Плясунова С.А. Клеточный состав пуповинной крови доношенных новорожденных: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2006. – 21 с.
11. Райдан М. Повышенная устойчивость недифференцированных и опухолевых клеток к повреждающему действию
2. Cryopreservation results in increasing macrophage phagocytic activity on the background of reduction of general antibacterial activity (NBT and NE) of HCBL cells.

### References

1. Actual problems of pathophysiology: selected lectures. Study guide for students of medical universities / Ed. by B.B. Moroz. – Moscow: Meditsyna, 2001. – 424 p.
2. Aleksandrov M.G., Kudryavitsky A.I., Rumyantseva E.G. et al. Determination method of absolute indices of phagocytosis // Laboratornoe Delo. – 1988. – №9. – P. 30–32.
3. Boyko V.V., Grischenko V.I., Krivoruchko I.A. et al. Application of cord blood in patients with gastric hemorrhage of ulcerative genesis // Ukr. Zhurnal Maloinvazivnoi ta Endoskopichnoi Khirurgii. – 2001. – №5(1). – P. 11–12.
4. Goltsev A.N., Kalinichenko T.A. Umbilical human cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part 2. Immunological characteristics // Problems of Cryobiology. – 1988. – №1. – P. 3–24.
5. Goltsev K.A., Krivoruchko I.A., Achigbesov K.A. et al. Application of cryopreserved cord blood in complex therapy of acute pyoperitonitis in rats // Meditsyna Segodnya i Zavtra. – 2011. – №1–2 (50–51). – P. 24–30.
6. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Modification of state of lymphohemopoietic complex of an organism using products of fetoplacental complex // Transplantologiya. – 2001. – №3. – P. 5.
7. Lakin G.F. Biometry. – Moscow: Vysshaya shkola, 1980. – 293 p.
8. Lobyntseva G.S. Theoretical tasks of stem cell cryopreservation. Operating peculiarities of umbilical blood cryobank // Transplantologiya. – 2007. – Vol. 3, №1. – P. 104.
9. Microscopic technique: Manual for doctors and laboratory assistants / Ed. by D.S. Sarkisova and Yu.A. Perova. – Moscow: Meditsyna, 1996. – 543 p.
10. Plyasunova S.A. Cell composition of umbilical blood of full-term newborns: Abstract of the Thesis of Candidate of Medical Sciences. – Moscow, 2006. – 21 p.
11. Raydan M. Increased resistance of non-differentiated and cancer cells to impairing effect of low temperatures: Abstract of the Thesis of Candidate of Biological Sciences. – St. Petersburg, 2011. – 26 p.
12. Tsutsayeva A.A., Kudokotseva O.V., Scheglov A.V. et al. Cord blood as a component of maintenance therapy // Problems of Cryobiology. – 2001. №3. – P. 93.
13. Tsutsayeva A.A., Grischenko V.I., Prokopyuk O.S. et al. Washing-free method of cryopreservation of hemopoietic cells from human cord blood for clinical application: Guidelines. – Kharkov, 2000. – 20 p.
14. Tsutsayeva A.A., Glushko T.O., Lobasenko N.P. et al. Properties of cryopreserved transplants of stem hemopoietic cells // Transplantologiya. – 2004. – №3. – P. 374–377.
15. Tsutsayeva A.A., Tsyganenko A.Ya., Zheltyakova I.A. Influence of hypothermic storage before and after cryopreservation on properties of nucleated components and whole cord blood plasma // Problems of Cryobiology. – 2006. – Vol. 16, №1. – P. 45–55.
16. Tymbalyuk V.I., Zhilka N.Ya., Kidon' V.P., Bakhantsova N.M. Umbilical blood: perspectives of stem cell application // Zdorov'ya Ukrainy. – 2007. – №9. – P. 74.
17. Patent of Ukraine N31847A IPC A01N1/02. Method of cryopreservation of cord blood hemopoietic cells / A.O. Tsutsayeva, V.I. Grischenko, O.V. Kudokotseva et al. Applied 05.11.98. Publ. 15.12.2000. Bull. N7. – P. 1–10.
18. Berz D., McCormack E.M., Winer E.S. et al. Cryopreservation of hematopoietic stem cells // Am. J. Hematol. – 2007. – Vol. 82, №6. – P. 463–472.



- низких температур: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – СПб, 2011. – 26 с.
12. Цуцаева А.А., Кудокоцева О.В., Щеглов А.В. и др. Кордовая кровь как компонент поддерживающей терапии // Проблемы криобиологии. – 2001. – №3. – С. 93.
  13. Цуцаева А. А., Грищенко В. И., Прокопюк О. С. и др. Безотмывочный метод криоконсервирования гемопоэтических клеток кордовой крови человека для клинического применения: Метод. рекомендации. – Харьков, 2000 – 20 с.
  14. Цуцаева А.А., Глушко Т.О., Лобасенко Н.П. и др. Свойства криоконсервированных трансплантатов стволовых кровяных клеток // Трансплантология. – 2004. – №3. – С. 374–377.
  15. Цуцаева А. А., Цыганенко А.Я., Желтякова И.А. и др. Влияние гипотермического хранения до и после криоконсервирования на свойства ядерных компонентов и плазмы цельной кордовой крови человека // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №1. – С. 45–55.
  16. Цымбалюк В.И., Жилка Н.Я., Кидонь В.П., Баханцова Н.М. Пуповинная кровь: перспективы применения стволовых клеток // Здоров'я України. – 2007. – №9. – С. 74.
  17. Патент №31847А, МПК А01N1/02. Україна. Спосіб криоконсервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаєва, В.І. Грищенко, О.В. Кудокоцева та ін. Заявлено 05.11.1998; Опубл. 15.12.2000. Бюл. №7. – С. 1–10.
  18. Berz D., McCormack E.M., Winer E.S. et al. Cryopreservation of hematopoietic stem cells // *Am. J. Hematol.* – 2007. – Vol. 82, №6. – P. 463–472.
  19. Harner S., Noessner E., Nadas K. et al. Cord blood V $\alpha$ 24-V $\beta$ 11<sup>+</sup> natural killer T cells display a Th2-chemokine receptor profile and cytokine responses // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, №1. – e15714.
  20. Kadowaki N., Antonenko S., Ho S. et al. Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 193, №10. – P. 1221–1226.
  21. Ketheesan N., Whiteman C., Malczewski A.B. et al. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells // *Transfus. Apher. Sci.* – 2004. – Vol. 30, №1. – P. 47 – 54.
  22. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases // *Exp. Cell Res.* – 2002. – Vol. 277, №1. – P. 1–14.
  23. Urbanitz D., Fechner T., Grob R. Nitroblau–Tetrazolium (NBT) Test bei isolierten menschlichen Monozyten // *Blut.* – 1975. – Vol. 30, №3. – P. 187–198.
  24. Wachstein M.S. Histochemistry of leucocytes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1955. – Vol. 59, №5. – P. 1052–1065.