

# Структурно-функциональное состояние ядроконсервированных клеток кордовой крови в процессе криоконсервирования

О.А. МИХАЙЛОВА, П.М. ЗУБОВ, В.В. РЯЗАНЦЕВ, Л.А. БАБИЙЧУК  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Structural and Functional State of Cord Blood Nucleated Cells During Cryopreservation

O.A. MYKHAILOVA, P.M. ZUBOV, V.V. RYAZANTSEV, L.A. BABYCHUK  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В последнее время при лечении многих заболеваний используют криоконсервированную суспензию ядроконсервированных клеток (ЯСК) кордовой крови (КК) в качестве препарата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Эффективность их применения во многом определяется сохранением структурно-функциональной полноценности ЯСК после размораживания. В связи с этим целью данной работы было исследование сохранности и жизнеспособности ЯСК КК, состояния их антиоксидантной системы (АОС), а также изменений липидной асимметрии мембран клеток на всех этапах криоконсервирования по разработанному нами методу.

Выделение фракции ЯСК из цельной КК человека производили с использованием декстрана (м.м. 60000). Замораживали клетки под защитой 5% ДМСО по разработанной нами программе. Фенотипирование ЯСК (CD45<sup>+</sup>) КК проводилось на проточном цитофлуориметре FACS Calibur с использованием реагентов BD. Жизнеспособность (7AAD), нарушение липидной асимметрии мембран (AnnexinV) и продукцию активных форм кислорода (АФК) (DCFH<sub>2</sub>-DA) ЯСК оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Было показано, что при выделении и обработке ЯСК ДМСО сохранность и жизнеспособность клеток снижались. Анализ изменений липидной асимметрии мембран с помощью AnnexinV (маркера начальной стадии апоптоза) не показал увеличения количества AnnexinV<sup>+</sup>-клеток по сравнению с цельной КК. Интенсивность флуоресценции DCF (*I*<sub>DCF</sub>) ЯСК после процедуры выделения существенно не отличалась от показателей в цельной КК, а обработка клеток ДМСО приводила к повышению уровня внутриклеточных АФК, о чем свидетельствует прирост *I*<sub>DCF</sub>. Добавление экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> как к выделенным, так и к обработанным ДМСО ЯСК не влияло на временную динамику *I*<sub>DCF</sub> по сравнению с клетками цельной КК, что свидетельствует о сохранении АОС клеток в состоянии, сходном с нативным в цельной КК.

Дальнейшая процедура замораживания-отогрева позволяла получить до 80% ЯСК с сохранением высокого уровня их жизнеспособности (81,3±2,5% CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>). При этом количество AnnexinV<sup>+</sup>-клеток составляло 7,35±1,25%, что свидетельствует о сохранении структурной полноценности ЯСК. *I*<sub>DCF</sub> после криоконсервирования ЯСК существенно не изменялась, однако при добавлении экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> временная динамика *I*<sub>DCF</sub> отличалась от показателей до замораживания, но с течением времени данные различия нивелировались, что говорит об отсутствии существенных изменений в работе АОС клеток после размораживания.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что криоконсервирование ЯСК КК по разработанному нами методу позволяет сохранять структурно-функциональную полноценность и жизнеспособность клеток на достаточно высоком уровне.

Nowadays the treatment of many diseases is performed with cryopreserved suspension of cord blood (CB) nucleated cells (NC), as a preparation containing hematopoietic stem cells (HSC). Efficiency of their application is mainly determined by the preservation of structural and functional integrity of NC after thawing. In this context, the research aim was to investigate the integrity and viability of CB NC, the state of their antioxidant system (AOS), as well as the changes of lipid asymmetry in cell membranes at all the stages of cryopreservation method developed by us.

NC fraction was isolated from the whole cord blood using dextran (m.m. 60,000). Cells were frozen under protection of 5% DMSO by designed by us program. Phenotyping of CB NC (CD45<sup>+</sup>) was carried out by means of flow cytometer FACS Calibur using BD reagents. The viability (7AAD), disorder of lipid membrane asymmetry (AnnexinV) and production of reactive oxygen species (ROS) (DCFH<sub>2</sub>-DA) of the NC was evaluated by the method of flow cytometry. It was shown that during NC isolation and their treatment by DMSO the survival and viability decreased. The analysis of membrane lipid asymmetry changes with AnnexinV (the marker of initial apoptosis stage) did not show the increase of AnnexinV<sup>+</sup> cells comparing with the data of untreated whole cord blood. The DCF fluorescence intensity (*I*<sub>DCF</sub>) in NC after isolation did not differ significantly from the indices of the whole CB, and the treatment of cells with DMSO led to the rise of intracellular ROS level, testified by the increased *I*<sub>DCF</sub>. The addition of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the isolated as well as to the treated by DMSO cells did not affect the temporal dynamics of *I*<sub>DCF</sub> comparing with the cells of the untreated whole CB testifying to the preservation of AOS in the state similar with native one in the whole CB.

Further freeze-thawing allowed to obtain up to 80% of NC with a high viability level (81.3 ± 2.5% CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>). Moreover, the number of AnnexinV<sup>+</sup> cells was 7.35 ± 1.25%, that testified to the preservation of structural integrity of NC. *I*<sub>DCF</sub> after NC cryopreservation was not changed significantly, however, after the addition of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> the temporal dynamics of *I*<sub>DCF</sub> differed from the indices before the freezing but in due time these differences were neutralized that may testify to the absence of significant changes in the function of AOS cells after thawing.

Thus, the obtained results testify to the fact that cryopreservation of CB NC according the method developed by allows to preserve structural-functional integrity and viability of cells at quite a high level.