

УДК 57.086.132:[611.018.53.618.48

А.К. Коваль*, Е.Д. Луценко, И.Г. Гриша, Л.В. Сокол, Н.А. Бондарович,
М.В. Останков, Е.Е. Ямпольская, Л.В. Останкова, А.Н. Гольцев

Влияние лиофилизации на сохранность структурно-функциональных характеристик лейкоконцентрата кордовой крови человека

UDC 57.086.132:[611.018.53.618.48

G.K. Koval*, O.D. Lutsenko, I.G. Grisha, L.V. Sokil, M.O. Bondarovich,
M.V. Ostankov, K.Ye. Yampolskaya, L.V. Ostankova, A.M. Goltsev

Impact of Lyophilisation on Integrity of Structural and Functional Characteristics of Human Cord Blood Leukoncentrate

Реферат: Исследовали влияние условий лиофилизации на структурно-функциональные характеристики лейкоконцентрата кордовой крови человека (ЛККЧ): количество и жизнеспособность, цитоморфологические показатели, содержание гемопоэтических стволовых (CD34⁺) и Т-регуляторных клеток (CD4⁺CD25^{high}), кроветворных колониобразующих единиц в культуре (КОЕк). Для лиофилизации клеток ЛККЧ использовали четыре режима, включающие две программы с применением 3,5% ДМСО и без него. Программы отличались значением температуры и длительностью, при которых проводили первичное высушивание. При использовании первой программы клетки высушивали в течение 10 ч (–28°C), второй программы – 9 ч (–18°C). Разработанный метод лиофилизации ЛККЧ, который предполагал использование первой программы без ДМСО, обеспечил сохранность клеток в гетерогенной популяции кордовой крови по всем исследуемым характеристикам.

Ключевые слова: лиофилизация, лейкоконцентрат кордовой крови человека, колониобразующие единицы, гемопоэтические стволовые клетки, Т-регуляторные клетки.

Реферат: Досліджували вплив умов ліофілізації на структурно-функціональні характеристики лейкоконцентрату кордової крові людини (ЛККЛ): кількість і життєздатність, цитоморфологічні показники, вміст гемопоетичних стовбурових (CD34⁺) і Т-регуляторних клітин (CD4⁺CD25^{high}), кроветворних колонієутворюючих одиниць у культурі (КУОк). Для ліофілізації клітин ЛККЛ використовували чотири режими, що включають дві програми із застосуванням 3,5% ДМСО й без нього. Програми відрізнялися значенням температури й тривалістю, при яких проводили первинне висушування. При використанні першої програми клітини висушували протягом 10 годин (–28°C), другої програми – 9 годин (–18°C). Розроблений метод ліофілізації ЛККЛ, що передбачає використання першої програми без ДМСО, забезпечив схоронність клітин у гетерогенній популяції кордової крові за всіма досліджуваними характеристиками.

Ключові слова: ліофілізація, лейкоконцентрат кордової крові людини, колонієутворюючі одиниці, гемопоетичні стовбурові клітини, Т-регуляторні клітини.

Abstract: This paper presents the investigations on the impact of lyophilisation conditions on structural and functional characteristics of human cord blood leukoconcentrate (HCBL) such as: the number and viability, cytomorphological indices, content of hematopoietic stem (CD34⁺) and T-regulatory cells (CD4⁺CD25^{high}), hematopoietic colony forming units in culture (CFUc). Four regimens, including two programs with and without 3.5% DMSO were used for HCBL cell lyophilisation. The programs differed in temperature value and duration wherein the primary drying proceeded. When using the first program, the cells were dried for 10 hrs (–28°C), and 9 hrs (–18°C) for the second one. The designed method for HCBL lyophilisation, suggested the use of the DMSO-free first program, ensured the cell preservation in a heterogeneous population of cord blood according to all the studied characteristics.

Key words: lyophilisation, human cord blood leukoconcentrate, colony forming units, hematopoietic stem cells, T-regulatory cells.

Кордовая кровь человека (ККЧ) является доступным источником стволовых клеток с высоким регенеративным потенциалом [12]. Благодаря наличию в составе разных типов клеток и ростовых факторов кордовая кровь имеет высокий пролиферативно-дифференцировочный потенциал [19]. Клетки ККЧ применяют для лече-

Human cord blood (HCB) is an available source of stem cells with a high regenerative potential [19]. Due to the presence of different cell types and growth factors, the cord blood has a high proliferative and differentiating potential [11]. The HCB cells are used in therapy of autoimmune [12, 24], oncology [15] diseases, as well as in gerontological

Відділ кріопатофізіології та імунології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: cryopato@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: cryopato@gmail.com

Надійшла 13.03.2019

Прийнята до друку 14.11. 2019

Received March, 13, 2019

Accepted November, 14, 2019

© 2019 G.K. Koval, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ния аутоиммунных [6, 11], онкологических [22] заболеваний, а также в геронтологической практике для увеличения продолжительности жизни и комплексного омоложения человека [15].

Востребованность ККЧ в клинике обуславливает необходимость создания ее запасов [14, 25]. Для этой цели необходимы низкотемпературные банки, в которых ККЧ длительно хранится при ультранизких температурах (-80 , -196°C), что обеспечивает сохранность структурно-функциональных характеристик клеток разного уровня дифференцировки и регуляторных медиаторов [3, 18]. При криоконсервировании клеток млекопитающих используют криопротекторы, обладающие защитным эффектом от низкотемпературного воздействия. В большинстве случаев для замораживания ККЧ применяют криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) [14, 20].

Следует отметить, что недостатками хранения ККЧ в низкотемпературном банке являются существенные финансовые затраты на приобретение хладагента (жидкий азот) и обслуживание систем контроля за температурой в хранилищах, а также потенциальный риск загрязнения биоматериала и т. д.

Альтернативным способом долгосрочного хранения биоматериала может быть консервирование путем лиофилизации [4, 5, 24].

Принципы вакуумной сублимационной сушки описаны Н.С. Пушкарем и соавт. [10]. В работе показано, что переход связанной и свободной влаги из кристаллического состояния в газообразное (минуя жидкую фазу) возможен только при определенных физических условиях (температура и вакуум), обусловленных природой и свойствами жидкой среды.

В настоящее время лиофилизация применяется для длительного хранения плазмы крови и ее отдельных фракций, иммунных сывороток, иммуноглобулинов, вакцин, антибиотиков, гормонов, прокариотических и эукариотических клеток [1, 2, 16, 26, 28]. Лيوфилизированные клетки ККЧ, в отличие от криоконсервированных, в меньшей степени подвергаются структурным изменениям, не утрачивают присущих им свойств при длительном хранении, хорошо растворяются в воде, удобны для транспортировки. Кроме того, лиофилизированный материал не требует специальных условий для долгосрочного хранения в низкотемпературном банке, что экономически более выгодно и удобно при использовании в клинической практике.

Важно отметить, что известные способы лиофилизации ККЧ [21, 24, 27] несовершенны, требуют много времени и использования сложных

практике для lifespan extension and integrated rejuvenation in humans [3].

The demand for HCB in clinic stipulates the need for its stocking [1, 23]. For this purpose, it is necessary to use the low-temperature banks, where HCB is stored for a long time at ultra-low temperatures (-80 , -196°C), that ensures the integrity of structural and functional characteristics of cells of various differentiation levels and regulatory mediators [8, 10]. For the mammalian cell cryopreservation the cryoprotectants with a protective effect against low temperature exposure are used. In most cases, for HCB freezing one applies dimethyl sulfoxide (DMSO) as cryoprotectant [9, 13].

Of note is the fact, that HCB storage in a low-temperature bank has some disadvantages, *i. e.* high costs for refrigerant (liquid nitrogen) purchasing and maintenance of temperature control systems in storage facilities, as well as the potential risk for biomaterial contamination, *etc.*

An alternative way for biomaterial long-term storage may be the preservation via lyophilisation [6, 7, 20].

The principles of vacuum lyophilisation are described by N.S. Pushkar *et al.* [21]. They demonstrated the transition of a bound and free moisture from a crystalline state to a gaseous one without passing through a liquid phase as only possible under certain physical conditions (temperature and vacuum), stipulated by nature and properties of liquid medium.

Currently, the lyophilisation is applied for a long-term storage of blood plasma and its individual fractions, immune sera, immunoglobulins, vaccines, antibiotics, hormones, prokaryotic and eukaryotic cells [2, 4, 24, 26, 28]. The lyophilised HCB cells unlike the cryopreserved ones, are less exposed to structural changes, do not lose their inherent properties during prolonged storage, being well dissolved in water, and convenient for transportation. Moreover, the lyophilised material requires no special conditions for a long-term storage at the low-temperature bank, that is more cost-efficiently and preferred for use in clinical practice.

It should be noted that the known methods for HCB lyophilisation [20, 25, 27] are not ideal, requiring much time and composite cryoprotectants. These facts imply the improvement of the existing lyophilisation techniques.

The research aim was to design an efficient way for lyophilisation of human cord blood leukoconcentrate to ensure its long-term storage with preserving structural and functional characteristics of cells.



растворов лиопротекторов. Этими обстоятельствами обусловлена необходимость усовершенствования существующих способов лиофилизации.

Цель работы – разработка эффективного способа лиофилизации лейкоконцентрата кордовой крови человека для обеспечения длительного его хранения с сохранением структурно-функциональных характеристик клеток.

Материалы и методы

Объектом исследования были образцы ККЧ ($n = 15$), которые получали от здоровых рожениц из материнского конца пуповины после нормальных родов. Забор ККЧ проводили с информированного согласия женщины непосредственно после рождения ребенка. Кордовую кровь человека отбирали в стерильные флаконы с антикоагулянтом СРД (цитратно-фосфатно-декстрозный раствор). Перед получением лейкоконцентрата кордовой крови человека флаконы с ККЧ хранили в бытовом холодильнике при 4°C .

Лейкоконцентрат кордовой крови человека (ЛККЧ) получали в аутоплазме путем пассивной седиментации эритроцитов в градиенте плотности с добавлением полиглюкина («Биохимик», Россия). Суспензию клеток ЛККЧ разливали по 1 мл в стерильные пенициллиновые флаконы, которые помещали в сублимационную установку «УЗВ-2» (СКТБ с ОП при Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины), проводили лиофилизацию. Были апробированы четыре режима лиофилизации ЛККЧ. Режим 1 (P1) заключался в охлаждении образцов ЛККЧ со скоростью 0,5 град/мин от комнатной температуры ($18\text{--}22^{\circ}\text{C}$) до -28°C и дальнейшем 10-часовом высушивании в указанной сублимационной установке. Образцы досушивали в той же установке при температуре 15°C в течение 2 ч. Длительность всего процесса сушки составляла 12 ч. Режим 2 (P2) предусматривал аналогичное P1 высушивание образца с добавлением ДМСО («Arterium», Украина), разведенного в аутоплазме до конечной концентрации 3,5%. Выбор концентрации ДМСО основывался на данных о токсичности ДМСО и результатах работы Е.Е. Макашовой и соавт. [7], в которой показано, что экспозиция ядродержащих клеток ККЧ с ДМСО в концентрации выше 5% снижает их сохранность и жизнеспособность. При режиме 3 (P3) образец ЛККЧ предварительно замораживали до -18°C на полках камеры сублимационной установки. Высушивание ЛККЧ проводили в охлажденной до -18°C камере сублимационной установки на протяжении 9 ч, досушивание – при темпера-

Materials and methods

The research objects were the HCB specimens ($n = 15$), procured from healthy women in labor from the mother's end of umbilical cord after normal delivery. The HCB was taken with the informed consent of woman immediately after child birth. Human cord blood was collected into sterile vials with CPD (citrate-phosphate-dextrose solution) anticoagulant. Prior to procure the human cord blood leukoconcentrate, the vials with HCB were stored in a household refrigerator at 4°C .

Human cord blood leukoconcentrate (HCBL) was procured in autoplasm by passive erythrocyte sedimentation in a density gradient supplemented with Polyglucinum (OJSC Biokhimik, Russia). The HCBL cell suspension was poured into 1 ml sterile penicillin vials, placed in a sublimation unit 'UZV-2' (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine) and lyophilised. We have tested four regimens of HCBL lyophilisation. The regimen 1 (R1) comprised the HCBL specimen cooling with 0.5 deg/min rate from room temperature ($18\text{--}22^{\circ}\text{C}$) down to -28°C and further 10-hour drying in the mentioned lyophilisation unit. The specimens were finally dried with the same device at 15°C for 2 hrs. The duration of the entire drying was 12 hrs. The regimen 2 (R2) foresaw the specimen drying similar to R1, supplemented with DMSO (Arterium, Ukraine), diluted in autoplasm up to a final concentration of 3.5%. The choice of DMSO concentration was based on the data about DMSO toxicity and the ones reported by E.E. Makashova *et al.* [16], where the exposure of nucleated HCB cells with DMSO at a concentration above 5% was shown to reduce their survival and viability. In the regimen 3 (R3), the HCBL specimen was preliminarily frozen down to -18°C on shelves of sublimation chamber. The HCBL was dried in a chamber of lyophilisation unit, cooled down to -18°C within 9 hrs, the final drying was done at 15°C for 2 hrs. Regimen 4 (R4) meant the HCBL lyophilisation similar to R3, supplemented with 3.5% DMSO. The drying temperature was controlled by a copper constant thermocouple. Under all the regimens of HCBL lyophilisation, the residual pressure in the chamber corresponded to 1.32 Pa. The vials with lyophilised HCBL (IHCBL) were sealed with rubber stoppers with metal caps and filled with paraffin to avoid humidity. The lyophilised specimens were stored in refrigerator at 4°C . The quality of lyophilised material was assessed by residual moisture in percentage using the commonly accepted gravimetric analysis, and visually. The residual mois-



туре 15°C в течение 2 ч. Режим 4 (P4) предусматривал лиофилизацию ЛККЧ аналогично P3 с добавлением 3,5% ДМСО. Температуру высушивания контролировали медь-константанной термопарой. При всех режимах лиофилизации ЛККЧ остаточное давление в камере соответствовало 1,32 Па. Флаконы с лиофилизированным ЛККЧ (ЛЛККЧ) закрывали резиновыми пробками с металлическими крышками и заливали парафином для предупреждения попадания влаги. Лиофилизированные образцы хранили в условиях холодильника при 4°C. Качество лиофилизованного материала оценивали по остаточной влажности в процентах общепринятым весовым методом, а также визуально. Остаточная влажность в лиофилизированных по P1 образцах составляла (5,03 ± 0,51); P2 – (14,66 ± 1,73); P3 – (4,95 ± 0,88); P4 – (17,78 ± 2,1)%. Для регидратации ЛЛККЧ во флаконы добавляли 1 мл физиологического раствора и периодически осторожно перемешивали.

В образцах ЛККЧ определяли количество ядросодержащих клеток на 1 мл в геманализаторе («Diatron», Венгрия). Жизнеспособность клеток оценивали в общей популяции лейкоконцентрации методами суправитального окрашивания 0,2%-м раствором трипанового синего [8] и на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD Bioscience», США) с использованием пропидий йодида (PI). Содержание в составе ЛККЧ стволовых кроветворных клеток (СКК), Т-регуляторных клеток (Трег) оценивали с использованием соответствующих моноклональных антител (МАТ) к CD34-, CD4- и CD25-молекулам («BD Pharmingen», США). Во всех случаях исследований применяли соответствующий изотипический контроль. Определяли количество меченых клеток и среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) исследуемых маркеров, отражающую плотность антигенов, выраженную в условных единицах. Результаты цитофлуориметрического анализа обрабатывали с помощью программы «WinMDI 2.8» («J. Trotter, Scripps Research Institute», США). Цитологическое исследование ЛККЧ проводили на мазках-отпечатках, окрашенных азур-II эозином по Романовскому-Гимзе [9] в световом микроскопе «Primo Star» («Carl Zeiss», Германия); ×900 (масляная иммерсия) подсчетом 500 клеток, выражая в процентах [9]. Содержание кроветворных предшественников определяли по количеству колониеобразующих единиц в культуре (КОЕк) в полужидком агаре на 8-е сутки культивирования в инвертированном микроскопе «Axiovert 40C», («Care Zeiss», Германия; ×70). Клетки культивировали в концентрации

в образцах лиофилизированных с R1 (5.03 ± 0.51); for R2 it made (14.66 ± 1.73); R3 revealed (4.95 ± 0.88); R4 provided (17.78 ± 2.1)%. To rehydrate the HCBL, the vials were supplemented with 1 ml of physiological saline and repeatedly carefully stirred.

The number of nucleated cells per 1 ml was determined in HCBL specimens using blood analyzer (Diatron, Hungary). Cell viability was assessed in general population of leukoconcentrate by supravital staining with 0.2% trypan blue solution [18] and with FACS Calibur flow cytometer (BD Bioscience, USA) using propidium iodide (PI). The content of hematopoietic stem cells (HCCs) and T-regulatory cells within HCBL was evaluated using the corresponding monoclonal antibodies (MAB) for CD34, CD4, and CD25 molecules (BD Pharmingen, USA). In all the cases, the appropriate isotypic control was used. The number of labelled cells and average fluorescence intensity (AFI) of the studied markers, reflecting the density of antigens, expressed in arbitrary units, were determined. The results of cytofluorimetric analysis were processed with WinMDI 2.8 software (J. Trotter, Scripps Research Institute, USA). The HCBL was cytologically examined in touch smears, stained with azure-II eosin by Romanowsky-Giemsa [19] using Primo Star light microscope (Carl Zeiss, Germany); ×900 (oil immersion) by counting 500 cells, expressing in percentage [19]. The content of hematopoietic precursors was determined by the number of colony forming units in culture (CFUc) in semi-liquid agar to day 8 of culture by means of inverted microscope Axiovert 40C (Care Zeiss, Germany; ×70). Cells were cultured at a concentration of 1×10^5 cells/ml at 37°C, 5% CO₂ and 95% air humidity [22].

The findings were statistically processed with parametric method (Student t-test) using the Excel software (Microsoft, USA); at $p < 0.05$, the differences were considered statistically significant.

Results and discussion

The results of staining with trypan blue (97–98%) and PI (92–94%) testify to the fact that the selected conditions for preparing the HCBL handling suspension provided quite a high initial cell viability. The number of nucleated cells in HCBL specimens decreased in a different way, moreover in those, lyophilised by R2 and R4 it was much reduced (Fig. 1). The index of cell viability in HCBL varied between 32–60% (trypan blue) and 27–54% (PI) depending on lyophilisation conditions. The highest cell viability was found in the HCBL specimens, lyophilised by R1 and R3. In the spe-



1×10^5 кл/мл при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% влажности воздуха [13].

Статистическую обработку полученных данных проводили параметрическим методом (t-критерий Стьюдента) с применением программы «Excel» («Microsoft», США), при $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Результаты теста окрашивания трипановым синим (97–98%) и PI (92–94%) свидетельствуют о том, что выбранные условия приготовления рабочей суспензии ЛККЧ обеспечивали достаточно высокий исходный уровень жизнеспособности клеток. Количество ядросодержащих клеток в образцах ЛККЧ уменьшалось не одинаково, причем в большей степени – в образцах, лиофилизированных по P2 и P4 (рис. 1). Показатель жизнеспособности клеток в ЛККЧ варьировал в пределах 32–60% (трипановый синий) и 27–54% (PI) в зависимости от условий лиофилизации. Наиболее высоким показатель жизнеспособности клеток был в образцах ЛККЧ, лиофилизированных по P1 и P3. В образцах, лиофилизированных с применением ДМСО в концентрации 3,5% (P2 и P4), данный показатель был значимо ниже, чем в образцах, лиофилизированных по P1 и P3.

Известно, что ЛККЧ является гетерогенной популяцией клеток (рис. 2), в которой кроме СКК разной степени дифференцировки присутствуют и зрелые клеточные элементы с разной устойчивостью к факторам криоконсервирования [3].

В свете вышеизложенного представляло интерес проанализировать влияние процесса лиофилизации на клеточный состав ЛККЧ.

В свежее выделенном ЛККЧ (сЛККЧ) были выявлены клетки разной степени дифференцировки эритроидного, гранулоцитарного и лимфоцитарного ростков кроветворения (рис. 2, А; 3, А). Клеточный состав ЛККЧ при P1 и P3 был представлен морфологически сохранными эритробластами, миело- и лимфоцитами (рис. 2, В, D; рис. 3, В, D). Цитологический анализ ЛККЧ при P2 и P4 выявил уменьшение количества миелобластов, лимфоцитов при относительном увеличении количества недифференцированных клеток и эритробластов. Данные цитологического исследова-

цимов, lyophilised with 3.5% DMSO (R2 and R4), this index was significantly lower than in those lyophilised by R1 and R3.

It is known that the HCBL is a heterogeneous population of cells (Fig. 2), where in addition to HSCs of various degrees of differentiation, earlier there are also the mature cell elements with different cryopreservation resistance [8].

Proceeding from the mentioned above, of interest was to analyze the effect of lyophilisation on HCBL cell composition.

In the freshly isolated HCBL (fHCBL) we identified the cells with various degrees of differentiation of erythroid, granulocytic, and lymphocytic hematopoietic lineages (Fig. 2A; 3A). The cell composition of IHCBL at R1 and R3 was represented by morphologically preserved erythroblasts, myeloid and lymphocytes (Fig. 2B, D; Fig. 3B, D). The cytological analysis of IHCBL at R2 and R4 revealed a decrease in the number of myeloblasts and lymphocytes with a relative increase in the number of undifferentiated cells and erythroblasts. The data of cytological study testified to a high content of destroyed and apoptotic cells as compared to the control (Fig. 2C, E; 3C, E).

Quantitative assessment of HSCs showed that phenotypic characteristics (CD34⁺) and proliferative activity (CFUc) in all the specimens of IHCBL did not significantly differ from the control, *i. e.* the cells were highly resistant to lyophilization conditions (Table).

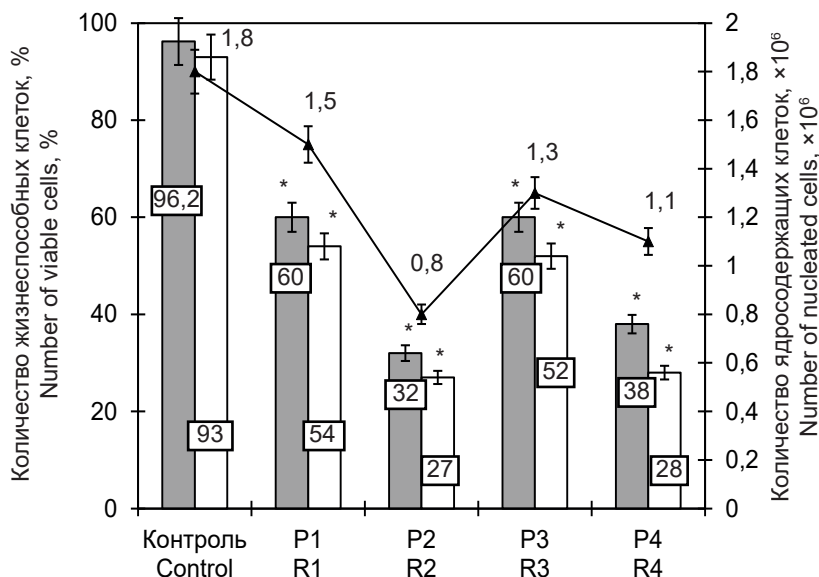


Рис. 1. Количество в ЛККЧ ядросодержащих клеток; жизнеспособность при окрашивании трипановым синим (■) и PI (□); * – различия значимы по сравнению с контролем; $p < 0,05$.

Fig. 1. Number of nucleated cells in IHCBL; viability at trypan blue staining (■) and PI (□); * – differences are significant as compared to the control; $p < 0.05$.



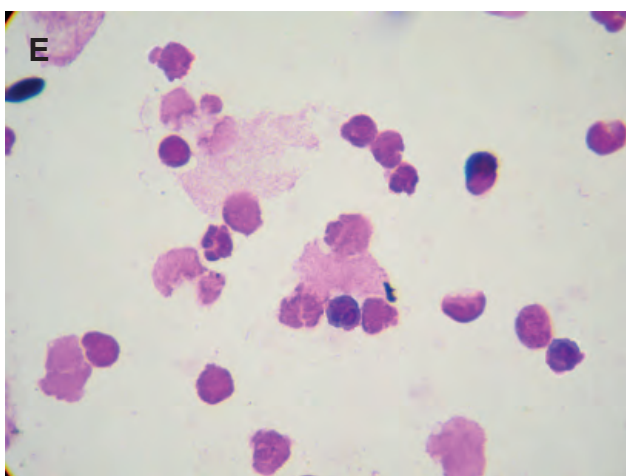
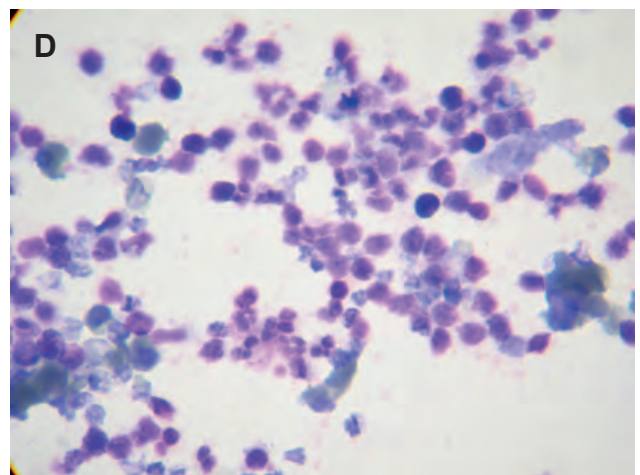
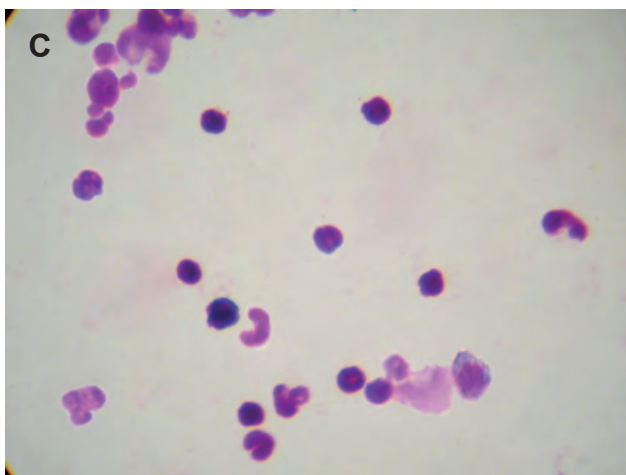
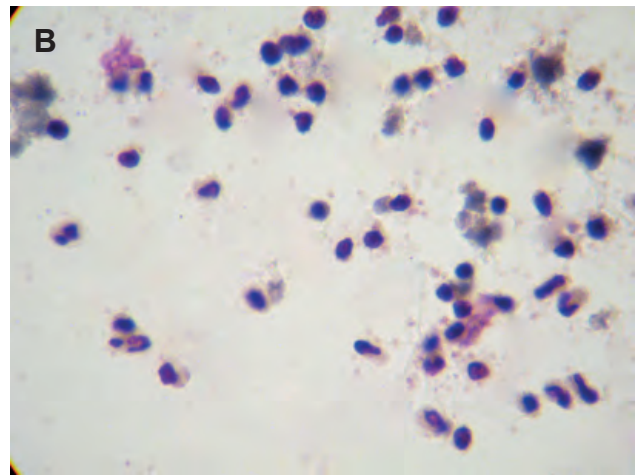
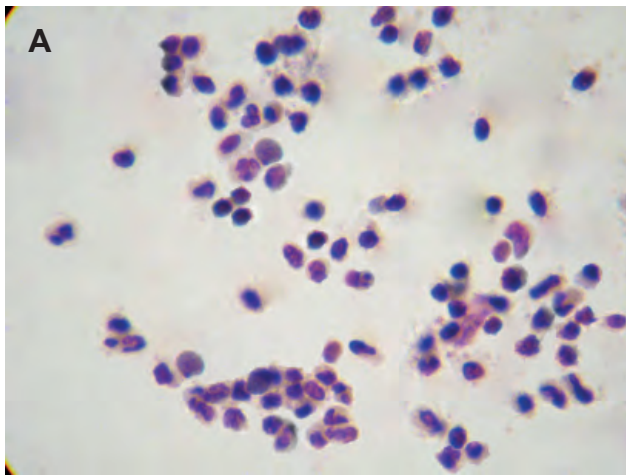


Рис. 2. Микрофотографии клеток: **А** – сЛККЧ; **В** – лЛККЧ по P1; **С** – лЛККЧ по P2; **Д** – лЛККЧ по P3; **Е** – лЛККЧ по P4. Окраска азур-II и эозином; $\times 900$.

Fig. 2. Microphotograph of cells: **A** – fHCBL; **B** – IHCBL by R1; **C** – IHCBL by R2; **D** – IHCBL by R3; **E** – IHCBL by R4. Staining with azur-II and eosin; $\times 900$.

ния свидетельствовали о высоком содержании разрушенных и апоптотических клеток по сравнению с контролем (см. рис. 2, С, Е; 3, С, Е).

Количественная оценка СКК показала, что фенотипические признаки ($CD34^+$) и пролиферативная активность (КОЕк) во всех образцах лЛККЧ значительно не отличалась от контроля, т. е. клетки обладали высокой устойчивостью к условиям лиофилизации (таблица).

Особенно важны в обеспечении сохранности лЛККЧ Трег-клетки, которые играют ключевую

The Treg cells, which play a key role in an immune system functioning, are of special importance in ensuring the IHCBL integrity, since they suppress the hyperimmune response to autoantigens and inhibit immune inflammatory responses to antigens of allogeneic grafts, fetal cells. According to our findings, the number of Treg cells in fHCBL was 0.2%, after lyophilisation this index increased 1.6 times, and AFI did 3 times as compared with the control (Fig. 4–6). The number of Treg cells, frozen-dried by different regimens was found not to significantly differ. Therefore, the lyophilisation may be considered as one of the methods for HCBL enriching with Treg cells if comparing with native and cryopreserved material.

In the specimens, lyophilised by R2 and R4, the index of residual moisture was higher as compared with those, lyophilised by other regimens. A high value of residual moisture was noted in lyophilised samples with a low preservation of structural and



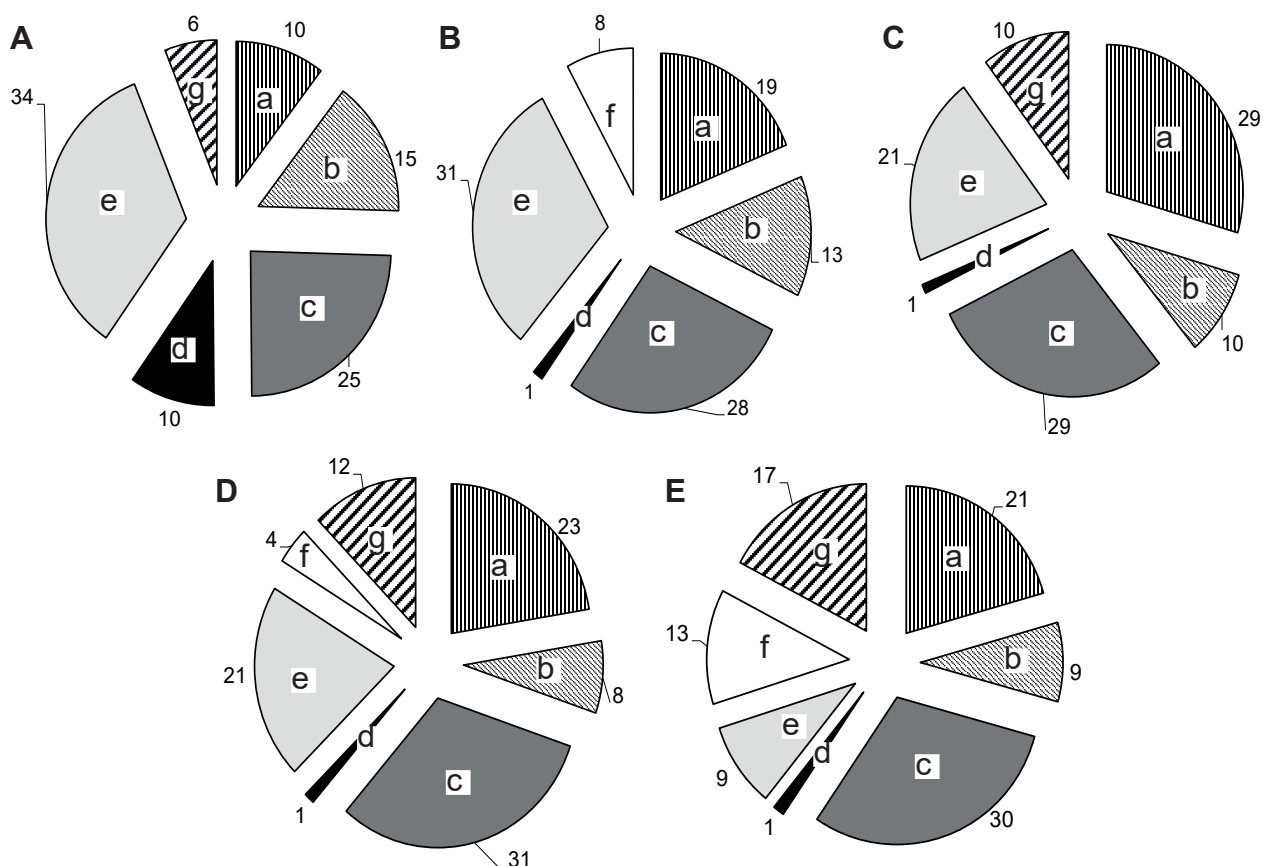


Рис. 3. Клеточный состав (в процентах): **A** – сЛККЧ; **B** – лЛККЧ по P1; **C** – лЛККЧ по P2; **D** – лЛККЧ по P3; **E** – лЛККЧ по P4; а – недифференцированные клетки, б – эритробласты, с – эритронормобласты, д – миелобласты, е – лимфоциты, ф – апоптотические клетки, г – разрушенные клетки.

Fig. 3. Cell composition (in percentage): **A** – fHCBL; **B** – IHCBL by R1; **C** – IHCBL by R2; **D** – IHCBL by R3; **E** – IHCBL by R4; а – undifferentiated cells, б – erythroblasts, с – erythronormoblasts, д – myeloblasts, е – lymphocytes, ф – apoptotic cells, г – destroyed cells.

роль в работе иммунной системы, поскольку они подавляют гипериммунный ответ в отношении аутоантигенов, ингибируют иммуновоспалительные реакции на антигены аллогенных трансплантатов, клеток плода. По нашим данным количество Трег-клеток в сЛККЧ составляло 0,2%, после лиофилизации показатель увеличился в 1,6 раза, а СИФ – в 3 раза по сравне-

functional characteristics, *i. e.* in IHCBL with DMSO supplement. In addition, of note is the fact, that before administration to a patient of the HCBL, lyophilised in DMSO-based solution, this compound has to be removed to neutralize a toxic effect on cardiovascular, respiratory and urinary systems [9, 17].

Currently, there are the methods for HCB lyophilisation, providing the satisfactory cell survival,

Количество CD34⁺-клеток и КОЕк ЛККЧ до и после лиофилизации по разным режимам
Number of CD34⁺-cells and CFUc of HCBL prior to and after lyophilisation by different regimens

Количество клеток, % Cell number, %	Контроль Control	Режимы Regimens			
		1	2	3	4
CD34 ⁺	3,9 ± 0,05	3,3 ± 0,06*	3,0 ± 0,04*	3,2 ± 0,05*	3,1 ± 0,03*
КОЕк CFUc	2,11 ± 0,87	1,84 ± 0,11	1,77 ± 0,09	1,92 ± 0,10	1,75 ± 0,12

Примечание: * – различия значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$.



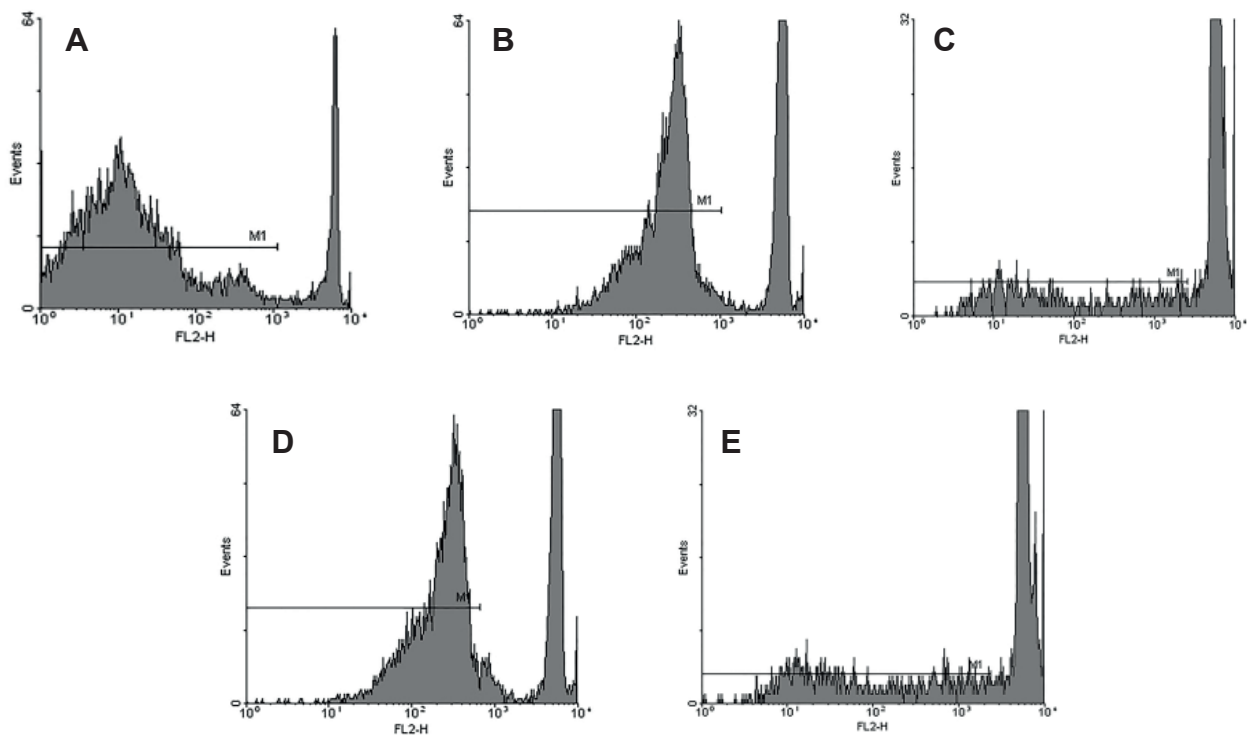


Рис. 4. Гистограммы жизнеспособности клеток: **A** – фЛККЧ; **B** – лЛККЧ по P1; **C** – лЛККЧ по P2; **D** – лЛККЧ по P3; **E** – лЛККЧ по P4. M1 – интервал положительных оценок. Окрашивание PI.

Fig. 4. Histograms of cell viability: **A** – fHCBL; **B** – iHCBL by R1; **C** – iHCBL by R2; **D** – iHCBL by R3; **E** – iHCBL by R4. M1 is positive rating range. PI staining.

нию с контролем (рис. 4–6). Установлено, что количество Трег-клеток, лиофилизированных по разным режимам, значимо не отличалось. Следовательно, лиофилизацию можно считать одним из методов обогащения ЛККЧ Трег-клетками по сравнению с нативным и криоконсервированным материалом.

В образцах, лиофилизированных по P2 и P4, показатель остаточной влажности имел более высокие значения по сравнению с образцами, лиофилизированными по другим режимам. Высокое значение остаточной влажности отмечено в лиофилизированных образцах с низкой сохранностью структурно-функциональных характеристик, т. е. в лЛККЧ с добавлением ДМСО. Кроме того важно отметить, что перед введением пациенту ЛККЧ, лиофилизированного в растворе на основе ДМСО, необходимо удаление данного соединения с целью нивелирования токсического действия на сердечно-сосудистую, дыхательную и мочевыделительную системы [17, 23].

В настоящее время известны способы лиофилизации ККЧ, которые обеспечивают удовлетворительную сохранность клеток, однако имеют определенные недостатки. Известен способ лиофилизации ККЧ, который включает

but having certain disadvantages. The way for HCB lyophilisation, including 3-hour cell cooling down to -40°C with 1–3 deg/min rate and further

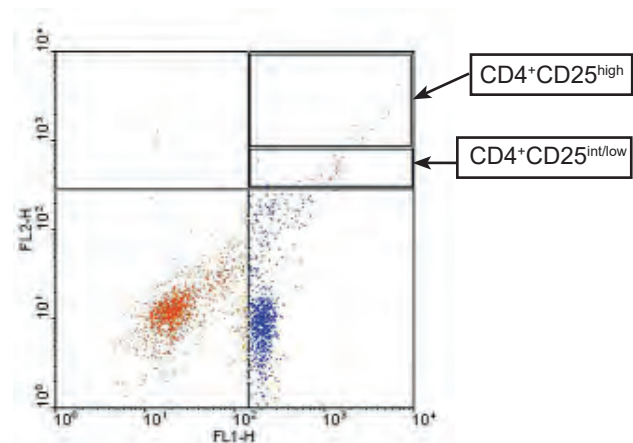


Рис. 5. Окрашивание $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ клеток ЛККЧ МАТ: точечный график распределения клеток исследуемой области в координатах логарифма интенсивности флуоресценции: ось X – интенсивность в канале FL-1 (связывание CD4-клетками); ось Y – интенсивность в канале FL-2 (связывание CD25-клетками).

Fig. 5. Staining of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ cells of HCBL with MAB: a scatter plot of cell distribution in the studied area in coordinates of fluorescence intensity logarithm: X axis is intensity in FL-1 channel (binding to CD4 cells); Y axis – intensity in FL-2 channel (binding to CD25 cells).



3-часовое охлаждение клеток до -40°C со скоростью 1–3 град/мин и дальнейшее высушивание в вакууме сначала при температуре 30°C (37 ч), а затем при 10°C (12 ч) [27]. Несмотря на то, что данный способ предусматривает использование защитного комбинированного раствора (40% поливинилпирролидона, 20% сахарозы и 10% маннитола), он обеспечивает высокую выживаемость клеток ($38,9 \pm 7,4\%$), но при этом высушивание длится около 49 ч. Подобные недостатки имеет и другой способ лиофилизации ККЧ, при котором образцы охлаждают до -38°C со скоростью 1–3 град/мин в течение 2,5 ч, а далее их высушивают в вакууме: сначала при температуре -30°C (31,5 ч), а далее – при 15°C (7 ч) [21]. Выживаемость клеток при данном способе лиофилизации под защитой 40% поливинилпирролидона, 20% сахарозы, 10% маннитола и 10% фетальной телячьей сыворотки составила ($61,87 \pm 3,5\%$). В работах других исследователей предложен способ лиофилизации ККЧ, при котором образцы охлаждают до -10°C со скоростью 0,5 град/мин, затем переносят в емкость с жидким азотом (-196°C) и высушивают при -80°C в течение 3,5 суток [24]. Этот способ имеет существенные недостатки: низкий показатель жизнеспособных клеток (18%) и его длительность.

На основе данных литературы и полученных результатов исследования структурно-функциональных характеристик и остаточной влажности полученных образцов было показано преимущество разработанного нами режима лиофилизации ЛККЧ. Так, качество лиофилизованного сЛККЧ по Р1 и ЛККЧ, предварительно замороженного до -18°C по Р3, не отличалось. Однако наиболее оптимальным был Р3, поскольку его можно использовать при отсутствии возможности проведения лиофилизации ЛККЧ сразу после получения.

Показано, что Р2 и Р4 с использованием 3,5% ДМСО уступали Р1 и Р3: высокая остаточная влажность образца, значимо снижены показатели сохранности и функции клеток по сравнению с контролем. Качество образца, лиофилизованного непосредственно после получения по Р2, по сравнению с образцом, предварительно замороженным с аналогичной концентрацией криопротектора при -18°C (Р4), было выше.

Разработанный режим лиофилизации позволяет сохранять структуру и функциональные свойства ЛККЧ длительное время (12 месяцев)

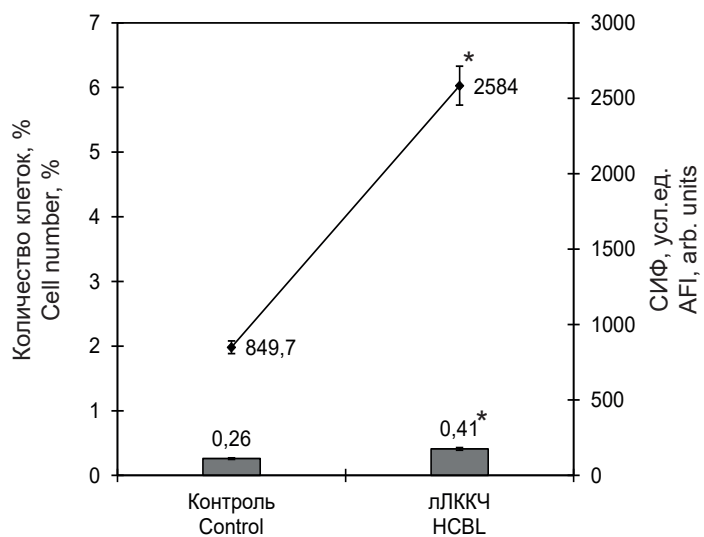


Рис. 6. Количество в ЛККЛ клеток $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ (■); СИФ (линия) * – разница статистически значима по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Fig. 6. Number of $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ cells in HCBL (■); AFI (line). * – differences are statistically significant if compared with the control $p < 0.05$.

drying in vacuum, first at 30°C (37 hrs), and then at 10°C (12 hrs) is well known [27]. Although this way foresees the use of a protective combined solution (40% polyvinylpyrrolidone, 20% sucrose and 10% mannitol), it provides a high cell survival ($38.9 \pm 7.4\%$), but herewith the drying takes about 49 hrs. The other way for HCB lyophilisation has the similar disadvantages, where the samples are cooled down to -38°C with 1–3 deg/min rate for 2.5 hrs, then dried in vacuum: first at -30°C (31.5 hrs) and then at 15°C (7 hrs) [25]. This lyophilisation way under protection of 40% polyvinylpyrrolidone, 20% sucrose, 10% mannitol and 10% fetal bovine serum provided the cell survival of $61.87 \pm 3.5\%$. Other scientists have proposed a way for HCB lyophilization, where the specimens are cooled down to -10°C with 0.5 deg/min rate, then transferred into a container with liquid nitrogen (-196°C) and dried at -80°C for 3.5 days [20]. This way has significant disadvantages such as: a low index of viable cells (18%) and its duration.

Proceeding from the reported data and our findings on structural and functional characteristics and residual moisture of the resulted specimens, we demonstrated the advantage of lyophilisation regimen for HCBL we designed. So, the quality of fHCBL lyophilised by R1 and the HCBL, preliminarily frozen down to -18°C by R3, did not differ. However, the R3 seemed to be the most optimal, since it could be used when there was no possibility to lyophilise HCBL right after procurement.



в условиях холодильника. Данный режим эффективен, экономичен, прост в исполнении и не требует применения химических консервантов, изменяющих биохимический состав и структуру клеток.

Выводы

1. Разработан режим лиофилизации ЛККЧ, обеспечивающий высокую сохранность структурно-функциональных характеристик клеток.

2. В результате отработки протоколов получения ЛККЧ был разработан альтернативный криоконсервированию способ долгосрочного хранения ЛККЧ для последующего применения в клинике при различных патологиях.

3. Предложенный режим позволяет применять ЛККЧ без специальных методов хранения и легко транспортировать его к месту назначения.

Литература

1. Ананьина АЕ, Цуцаева АА, Бальбердина ЛМ, и др. Лيوфилизация споровой культуры *Streptomyces aureofaciens*. Проблемы криобиологии. 2008; 18(4): 404–6.
2. Варламова ТИ, Кукунина ТВ, Жмыхов АА. Изучение влияния первичной кристаллизации на формирование макроструктуры лиофилизированного продукта при замораживании растворов лекарственных средств. Вестник современных исследований. 2017; 12(9): 6–11.
3. Гольцев АН, Волина ВВ, Останков МВ, и др. Влияние криоконсервирования на функциональные свойства ядро-содержащих клеток лейкоконцентрата кордовой крови человека. Проблемы криобиологии. 2010; 20(1): 66–72.
4. Гольцев АМ, Таранник ГК, Гриша ИГ, Сокол ЛВ, Бондарович МО, Останков МВ, Луценко ОД, Гольцев КА, Останкова ЛВ, винахідники; Інститут проблем криобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові. Патент України № 113006. 10.01.2017.
5. Гольцев АМ, Сокол ЛВ, Стецишин ВГ, Мосійчук ВВ, Бондарович МО, Гриша ИГ, Останков МВ, Луценко ОД, Останкова ЛВ, Чернищенко ЛГ, винахідники; Інститут проблем криобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб ліофілізації лейкоконцентрату кордової крові. Патент України № 125846. 25.05.2018.
6. Лебединец ВВ, Останкова ЛВ, Дубрава ТГ, и др. Применение криоконсервированной кордовой крови для коррекции иммунной системы в модели ишемического инсульта. Медицина сьогодні і завтра. 2015; (4): 20–9.
7. Макашова ОЕ, Бабійчук ЛО, Зубова ОЛ, Зубов ПМ. Оптимізація методу кріоконсервування ядромісних клітин кордової крові людини з використанням комбінації кріопротектора ДМСО та антиоксиданта N-ацетил-L-цистеїну. Проблемы криобиологии и кріомедицини. 2016; 26 (4): 295–307.
8. Меньшиков ВВ, редактор. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. Москва: Медицина, 1987. С. 123–5.
9. Меркулов ГА. Курс патологистологической техники. Ленинград: Медгиз; 1961. 343 с.

The R2 and R4 with 3.5% DMSO were shown to be inferior to R1 and R3, *i. e.* a high residual moisture of the specimen, significantly reduced indices of cell integrity and function as compared to the control, were observed. The quality of the specimen, lyophilised immediately after procurement by R2, in comparison with that, previously frozen with the same concentration of cryoprotectant at -18°C (R4), was higher.

The designed regimen of lyophilisation enables preserving the structure and functional properties of HCBL for a long time (12 months) in a refrigerator. This regimen is efficient, cost-effective, simple to use and requires no chemical preservatives that change biochemical composition and structure of cells.

Conclusions

1. The regimen for HCBL lyophilisation, ensuring a high preservation of structural and functional characteristics of cells, has been designed.

2. As a result of mastering the protocols for HCBL procurement, an alternative to cryopreservation way for HCBL long-term storage has been obtained for further use in clinic to treat various pathologies.

3. The proposed regimen enables using the HCBL without any special storage techniques and easily transporting it to a destination place.

References

1. Akel S, Regan D, Wall D, et al. Current thawing and infusion practice of cryopreserved cord blood: the impact on graft quality, recipient safety, and transplantation outcomes. *Transfusion*. 2014; 54(11): 2997–3009.
2. Ananyina AYe, Tsutsayeva AA, Balyberdina LM, et al. Lyophilisation of *Streptomyces aureofaciens* endospore culture. *Problems of Cryobiology*. 2008; 18(4): 404–6.
3. Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature*. 2017; 544 (7651): 488–92.
4. Dufresne J, Hoang T, Ajambo J, et al. Freeze-dried plasma proteins are stable at room temperature for at least 1 year. *Clin Proteomics* [Internet]. 2017 [cited 27.10.2017]; 14: 35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5659006/>
5. Frimel G., editor. [Immunological methods]. Moscow: Meditsina; 1987. 472 p. Russian.
6. Goltsev AM, Sokol LV, Stetsyshyn VG, Mosiychuk VV, Bondarovich MO, Grisha IG, Ostankov MV, Lutsenko OD, Ostankova LV, Chernyshenko LH inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of lyophilization of leukoconcentrate of cord blood]. Ukraine patent N 125846, 2018 May 25. Ukrainian.
7. Goltsev AM, Taranik GC, Grisha IG, Sokil LV, Bondarovich MO, Ostankov MV, Lutsenko OD, Goltsev KA, Ostankova LV, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of lyophilization of leukocon-



10. Пушкарь НС, Белоус АМ, Цветков ЦД. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования. Киев: Наукова думка; 1984. 264 с.
11. Таранник АК, Останкова ЛВ, Гриша ИГ, и др. Лиофилизированный лейкоконцентрат кордовой крови человека как корректор состояния иммунного статуса при лечении atopического дерматита (экспериментальное исследование). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(2): 165.
12. Фримель Г, редактор. Иммунологические методы. Москва: Медицина; 1987. 472 с.
13. Шерешков СИ. Культивирование гемопоэтических клеток на полутвердых питательных средах. Лабораторное дело. 1974; (3): 146–50.
14. Akel S, Regan D, Wall D, et al. Current thawing and infusion practice of cryopreserved cord blood: the impact on graft quality, recipient safety, and transplantation outcomes. Transfusion. 2014; 54(11): 2997–3009.
15. Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. Nature. 2017; 544 (7651): 488–92.
16. Dufresne J, Hoang T, Ajambo J, et al. Freeze-dried plasma proteins are stable at room temperature for at least 1 year. Clin Proteomics [Internet]. 2017 [cited 27.10.2017]; 14: 35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5659006/>
17. Ikeda K, Ohto H, Okuyama Y, et al. Adverse events associated with infusion of hematopoietic stem cell products: a prospective and multicenter surveillance study. Transfus Med Rev. 2018. 32(3): 186–94.
18. International standards for cord blood collection, banking, and release for administration. 6th ed. Omaha (NE): NetCord-FACT; 2016.
19. Knapp HF, Hammond CA, Hui T, et al. Single-cell analysis identifies a CD33+ subset of human cord blood cells with high regenerative potential. Nat Cell Biol. 2018; 20(6): 710–20.
20. Lecchi L, Giovanelli S, Gagliardi B, et al. An update on methods for cryopreservation and thawing of hemopoietic stem cells. Transfus Apher Sci. 2016; 54(3): 324–36.
21. Li J, Hua TC, Gu XL, Ding Y, et al. Morphology study of freeze-drying mononuclear cells of human cord blood. CryoLetters. 2005; 26(3): 193–200.
22. Lo Presti V, Nierkens S, Boelens JJ, van Til NP. Use of cord blood derived T-cells in cancer immunotherapy: milestones achieved and future perspectives. Expert Rev Hematol. 2018; 11(3): 209–18.
23. Maral S, Albayrak M, Pala C, et al. Dimethyl sulfoxide-induced tonic-clonic seizure and cardiac arrest during infusion of autologous peripheral blood stem cells. Cell Tissue Bank. 2018; 19(4): 831–2.
24. Natan D, Nagler A, Arav A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. Plos One [Internet]. 2009 [cited 21.04.2019]; 4 (4): e5240. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005240>
25. Takanashi M, Selogie E, Reems JA, et al. Current practices for viability testing of cryopreserved cord blood products: an international survey by the cellular therapy team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Transfusion. 2018; 58(9): 2184–91.
26. Tarannik AK, Ostanкова LV, Grisha IG, et al. Frozen-dried human cord blood leukoconcentrate as correcting agent of immune status when treating atop dermatitis (experimental study). Probl Cryobiol Cryomed. 2016; 26(2): 165.
27. Varlamova TI, Kukunina TV, Zhmykhov AA. [Study of the influence of primary crystallization on formation of lyophilized product macrostructure during freezing of drug solutions]. Vestnik Sovremennykh Issledovaniy. 2017; 12(9): 6–11. Russian.
28. Wakayama S, Ito D, Kamada Y, et al. Tolerance of the freeze-dried mouse sperm nucleus to temperatures ranging from –196°C to 150°C. Sci Rep [Internet]. 2019 [cited 09.11.2019]; 9(1): 5719. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-42062-8.pdf>.
29. Xiao HH, Hua TC, Li J, et al. Freeze-drying of mononuclear cells and whole blood of human cord blood. CryoLetters. 2004; 25(2): 111–20.
30. [Ukrainian patent 113006, 2017 Jan 10. Ukrainian].
31. Goltsev AN, Volina VV, Ostankov MV, et al. Effect of cryopreservation on functional properties of human cord blood leukoconcentrate nucleated cells. Problems of Cryobiology. 2010; 20(1): 66–72.
32. Ikeda K, Ohto H, Okuyama Y, et al. Adverse events associated with infusion of hematopoietic stem cell products: a prospective and multicenter surveillance study. Transfus Med Rev. 2018. 32(3): 186–94.
33. International standards for cord blood collection, banking, and release for administration. 6th ed. Omaha (NE): NetCord-FACT; 2016.
34. Knapp HF, Hammond CA, Hui T, et al. Single-cell analysis identifies a CD33+ subset of human cord blood cells with high regenerative potential. Nat Cell Biol. 2018; 20(6): 710–20.
35. Lebedinets VV, Ostanкова LV, Dubrava TG, et al. [Use of cryopreserved cord blood to correct immune system in a model of ischemic stroke]. Medytsyna Sogodni i Zavtra. 2015; (4): 2–9. Russian.
36. Lecchi L, Giovanelli S, Gagliardi B, et al. An update on methods for cryopreservation and thawing of hemopoietic stem cells. Transfus Apher Sci. 2016; 54 (3): 324–36.
37. Li J, Hua TC, Gu XL, Ding Y, et al. Morphology study of lyophilisation mononuclear cells of human cord blood. CryoLetters. 2005; 26(3): 193–200.
38. Lo Presti V, Nierkens S, Boelens JJ, van Til NP. Use of cord blood derived T-cells in cancer immunotherapy: milestones achieved and future perspectives. Expert Rev Hematol. 2018; 11(3): 209–18.
39. Makashova OE, Babichuk LO, Zubova OL, Zubov PM. Optimization of cryopreservation technique for human cord blood nucleated cells using combination of cryoprotectant DMSO and antioxidant N-acetyl-L-cysteine. Probl Cryobiol Cryomed. 2016; 26(4): 295–307.
40. Maral S, Albayrak M, Pala C, et al. Dimethyl sulfoxide-induced tonic-clonic seizure and cardiac arrest during infusion of autologous peripheral blood stem cells. Cell Tissue Bank. 2018; 19(4): 831–2.
41. Menshikov VV, editor. [Laboratory methods for research in clinics]. Moscow: Meditsina, 1987. p. 123–5. Russian.
42. Merkulov GA. [The course of histological-pathological technics]. Leningrad: Medgiz; 1961. 343 p. Russian.
43. Natan D, Nagler A, Arav A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. Plos One [Internet]. 2009 [cited 21.04.2019]; 4 (4): e5240. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005240>
44. Pushkar NS, Belous A, Tsvetkov TsD [Theory and practice of cryogenic and sublimation preservation]. Kyiv: Naukova Dumka; 1984. 259 p. Russian.
45. Shereshkov S.I. [Culturing of hemopoietic cells on semisolid nutrient media]. Laboratornoe Delo. 1974; (3): 146–50. Russian.
46. Takanashi M, Selogie E, Reems JA, et al. Current practices for viability testing of cryopreserved cord blood products: an international survey by the cellular therapy team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Transfusion. 2018; 58(9): 2184–91.
47. Tarannik AK, Ostanкова LV, Grisha IG, et al. Frozen-dried human cord blood leukoconcentrate as correcting agent of immune status when treating atop dermatitis (experimental study). Probl Cryobiol Cryomed. 2016; 26(2): 165.
48. Varlamova TI, Kukunina TV, Zhmykhov AA. [Study of the influence of primary crystallization on formation of lyophilized product macrostructure during freezing of drug solutions]. Vestnik Sovremennykh Issledovaniy. 2017; 12(9): 6–11. Russian.
49. Wakayama S, Ito D, Kamada Y, et al. Tolerance of the freeze-dried mouse sperm nucleus to temperatures ranging from –196°C to 150°C. Sci Rep [Internet]. 2019 [cited 09.11.2019];



28. Zacarias MF, Binetti A, Bockelmann W, et al. Safety, functional properties and technological performance in whey-based media of probiotic candidates from human breast milk. *Int Microbiol.* 2019; 22(2): 265–77.
- 9(1):5719. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-42062-8.pdf>
27. Xiao HH, Hua TC, Li J, et al. Freeze-drying of mononuclear cells and whole blood of human cord blood. *CryoLetters.* 2004; 25(2): 111–20.
28. Zacarias MF, Binetti A, Bockelmann W, et al. Safety, functional properties and technological performance in whey-based media of probiotic candidates from human breast milk. *Int Microbiol.* 2019; 22(2): 265–77.

