

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЮ И ОЦЕНКЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ

Л.А. Бабийчук, О.В. Кудокотцева, П.М. Zubov, О.Л. Zubova

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Резюме. Разработан новый эффективный метод криоконсервирования ядросодержащих клеток из кордовой крови, а также показана важность выбора адекватных способов оценки их жизнеспособности.

Ключевые слова: кордовая кровь, ядросодержащие клетки, криопротекторы, криоконсервирование, жизнеспособность.

НОВІ ПІДХОДИ ДО КРИОКОНСЕРВУВАННЯ І ОЦІНКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЯДРОВІСНИХ КЛІТОК КОРДОВОЇ КРОВІ

**Л.О. Бабійчук, О.В. Кудокотцева, П.М. Zubov,
О.Л. Zubova**

Резюме. Розроблено новий ефективний метод криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, а також показана важливість вибору адекватних способів оцінки їх життєздатності.

Ключові слова: кордова кров, ядровмісні клітини, криопротектори, криоконсервування, життєздатність.

NEW APPROACHES FOR CRYOPRESERVATION AND ESTIMATION CORD BLOOD NUCLEATED CELLS VIABILITY

**L.A.Babiychuk, O.V. Kudokotseva, P.M. Zubov,
O.L.Zubova**

Summary. There was developed a new effective method of cord blood nucleated cells cryopreservation, and demonstrated the importance of the choice of adequate methods for their viability estimation.

Key words: cord blood, nucleated cells, cryoprotectants, cryopreservation, viability.

Адреса для листування:

Бабийчук Любовь Александровна
ул. Переясловская, 23, Харьков, 61015
Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины

Кордовая кровь (КК) общепризнанна полноценным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) наряду с костным мозгом и периферической кровью [1]. Преимуществами клеток КК являются относительная легкость получения, высокий пролиферативный потенциал и «наивность» иммунной системы трансплантата. Изначально клетки КК использовали для лечения злокачественных и незлокачественных заболеваний системы крови. Однако в последнее время была показана плюрипотентность и высокая пластичность ГСК КК, что позволило рассматривать их как потенциальный источник для клеточной терапии более широкого спектра заболеваний. В последние годы, кроме гемопоэтических стволовых CD34⁺ клеток, в КК были описаны мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, CD133⁺ популяция, которая имеет больший пролиферативный потенциал и является более ранними гемопоэтическими предшественниками, чем CD34⁺. Несколькими группами исследователей было показано наличие плюрипотентной популяции клеток КК, способной образовывать как мезенхимальные диффероны (остео-, хондро-, адипо- и миобластический), так и экспрессировать нейрональные и гепатоцитарные маркеры *in vitro* и *in vivo*. В настоящее время доказано, что различные популяции стволовых и прогениторных клеток КК могут быть подвергнуты дифференцировке *in vitro* во все виды нервных клеток и успешно

применяться в неврологии. Возможная дифференцировка клеток КК в гепатоциты позволит использовать этот вид биологического материала для репопуляции печени. Предпосылками к применению клеток КК для целей терапевтического ангиогенеза послужили работы по выделению предшественников эндотелия и ангиобластов. Опубликованы работы по эффективности трансплантации клеток КК при экспериментальном сахарном диабете, боковом амиотрофическом склерозе, системной красной волчанке [3].

Всезрастающее внимание со стороны ученых и врачей к использованию клеточных препаратов кордовой крови привело к необходимости создания банков кордовой крови, в которых образцы ядросодержащих клеток (ЯСК) КК хранятся в замороженном состоянии при температуре –196 °С в течение практически неограниченного времени без потери их биологических свойств [2].

Однако, учитывая небольшие объемы КК (в среднем, не более 100 мл), очень важным являются как заготовка максимального количества крови и максимально возможное выделение ЯСК (в том числе и CD34⁺-клеток), так и разработка эффективных методов криоконсервирования ЯСК КК с адекватной оценкой их функциональной полноценности.

В связи с этим целью данной работы явилась разработка эффективных методов криоконсервирования ЯСК КК, позволяющих использовать эти

клетки непосредственно после размораживания как в практической медицине, так и в научных целях, без дополнительной жесткой процедуры отмывания от криопротекторов, тем самым сохраняя качественный и количественный состав КК.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор КК производили после получения информированного согласия у беременной, которая проходила тщательный дородовой скрининг на наличие противопоказаний к донорству КК.

Экспузию крови осуществляли закрытым способом в систему для забора крови с 25 мл антикоагулянта из пупочной вены при естественных родах после рождения ребенка и отделения его от плаценты зажимом. Средний объем полученной КК в одном образце составлял 80 ± 20 мл. Объем ПК меньше 60 мл в работе не использовался.

Выделение фракции ЯСК из КК проводили методом седиментации в 6% растворе декстрана с молекулярной массой 60 000 (полиглюкин). В качестве криопротектора использовали либо непроницающий высокомолекулярный криопротектор полиглюкин, либо проникающий криопротектор ДМСО в конечной концентрации 3,5%, приготовленный на растворе полиглюкина. Добавление ДМСО проводили на ледяной бане в течение 15 мин во избежание гипертермии клеток. Замораживание клеток проводили на программном замораживателе фирмы Cryosap по медленной четырехэтапной программе. Оттаивание производили при $37-40^\circ\text{C}$ на водяной термостатируемой бане.

Количественный состав сохраненных ЯСК КК оценивали стандартными методами. Фенотипирование ЯСК ($\text{CD}45^+$) кордовой крови, в том числе и гемопоэтических ($\text{CD}34^+$) до и после криоконсервирования проводилось методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (США) с использованием реагентов Becton Dickinson по международному ISHAGE протоколу. Жизнеспособность ЯСК до и после криоконсервирования оценивали микроскопическим методом, используя суправитальный краситель — трипановый синий, а также флуоресцентный ДНК краситель 7AAD (BD), используя метод проточной цитофлуориметрии. Лабораторный скрининг на наличие инфекционных агентов проводили согласно Европейской Директивы (2004/23/ЕС) по установлению стандартов качества и безопасности донорства, получения, тестирования, обработки, хранения и распределения человеческих тканей и клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью удаления эритроцитов для дальнейшего замораживания КК использовали полиглюкин, так как он имеет ряд преимуществ перед другими веществами (фиколл, желатин, гидроксипропилкрахмал и др.), применяющимися для выделения ЯСК КК. Полиглюкин, во-первых, является легко дос-

тупным стандартным препаратом, широко используемым в трансфузиологии и не требующим отмывания клеточной взвеси перед его применением; во-вторых, полиглюкин, как и аутологичная плазма КК, является наиболее благоприятной средой для функционирования ЯСК КК.

Анализ сохранности ядросодержащих клеток, выделенных с применением в качестве седиментирующего раствора полиглюкина в соотношении с КК 1:1 показал, что данный метод выделения позволяет выделить до 80% ЯСК КК (в том числе и гемопоэтических) и не приводит к снижению их жизнеспособности, в отличие от клеток, выделенных в градиенте плотности фикола, где уже на этапе выделения и трехкратного отмывания наблюдается потеря жизнеспособности ЯСК ($7,6 \pm 2,4\%$ $\text{CD}45^+7\text{AAD}^+$ -клеток и $10,6 \pm 4,2\%$ $\text{CD}34^+7\text{AAD}^+$ -клеток).

Таким образом, применение метода седиментации эритроцитов КК для получения ЯСК позволяет практически полностью сохранить количественный и качественный состав мононуклеаров КК (в том числе и стволовых ($\text{CD}34^+$) клеток.)

В связи с необходимостью создания банков кордовой крови и полученных из нее клеточных препаратов разработка новых методов криоконсервирования кордовой крови является очень актуальной проблемой.

В настоящее время широко используемым методом для криоконсервирования ядросодержащих клеток КК является использование в качестве криопротектора ДМСО в конечной концентрации 7,5–10%. ДМСО должен быть удален до инфузии в силу своей токсичности. Удаление криопротектора после размораживания клеточной взвеси существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и приводит к потере части клеток в процессе отмывания, что в свою очередь снижает клиническую эффективность препаратов КК. Установлено, что основная токсичность, связанная с трансфузией ЯСК КК, криоконсервированных с ДМСО, обусловлена дозозависимыми эффектами переливаемого ДМСО. Побочные эффекты включают неприятный вкус или запах, тошноту, рвоту, спастические боли в животе, покраснение кожи лица и шеи, брадикардию и гипотонию. Как правило, эти симптомы проходят самостоятельно, но для профилактики токсических пирогенных и аллергических реакций во время трансфузии размороженного материала больному проводят стандартную десенсибилизирующую премедикацию.

В связи с вышеизложенным, для криоконсервирования ЯСК КК необходимо использовать ДМСО в минимально допустимых концентрациях (максимум 5%) при минимальном объеме инфузируемой суспензии ЯСК КК, что позволит вводить клеточную суспензию реципиентам без отмывания от криопротектора.

Предлагаемый нами безотмывочный метод криоконсервирования ЯСК КК заключается в

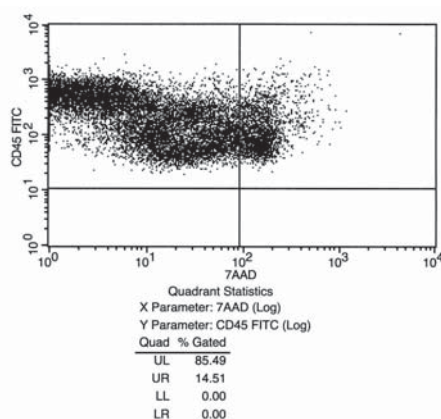


Рисунок 1. Жизнеспособность CD45⁺-клеток после криоконсервирования с ДМСО, приготовленным на полиглюкине.

предварительном концентрировании методом щадящего центрифугирования клеточной суспензии в объеме не более 3–5 мл и медленном добавлении на холоду раствора ДМСО на полиглюкине. Разработанная нами медленная четырехэтапная программа замораживания в сочетании с предлагаемым методом предобработки суспензии клеток позволяет снизить концентрацию ДМСО до 3,5% и получить после размораживания высокий процент жизнеспособных клеток (до 85% CD45⁺ 7AAD⁻ и до 95% CD34⁺ 7AAD⁻ -клеток) (рис. 1). Следует подчеркнуть, что снижение жизнеспособности общей популяции CD45⁺-клеток происходит в основном за счет гранулоцитов.

Следует обратить особое внимание на адекватность методов оценки сохранности и жизнеспособности ЯСК КК до и после криоконсервирования.

Проведенные нами эксперименты по криоконсервированию мононуклеаров КК, выделенных полиглюкином и замороженных только в присутствии непроникающего высокомолекулярного декстрана с молекулярной массой 60 000 (без добавления традиционного криопротектора ДМСО), показали, что количество сохраненных клеток, определяемых микроскопическим методом, было сопоставимо с данными, полученными при криоконсервировании в присутствии ДМСО. Интересно и то, что экспресс-метод определения жизнеспособных клеток с помощью суправитального красителя трипанового синего выявил незначительные различия между двумя сравниваемыми методами криоконсервирования ЯСК КК как в присутствии ДМСО и полиглюкина, так и в присутствии одного непроникающего криопротектора полиглюкина (96±3 и 93±5%, соответственно).

Однако оценка жизнеспособности ЯСК КК с использованием ДНК-красителя 7-ААД показала достоверные различия двух исследуемых подходов к замораживанию клеточной суспензии КК (рис. 2).

Следует подчеркнуть, что метод световой микроскопии в оценке жизнеспособности клеток не

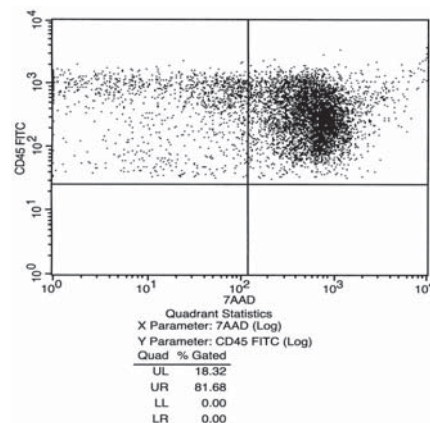


Рисунок 2. Жизнеспособность CD45⁺-клеток после криоконсервирования с полиглюкином.

является адекватным по нескольким причинам: во-первых, оценка жизнеспособности CD34⁺ клеток методом световой микроскопии невозможна в силу их морфологического сходства с популяцией CD45⁺ клеток и их малочисленности (до 1%), во-вторых, отсутствие окрашивания клеток трипановым синим не свидетельствует об истинной жизнеспособности клеток, а лишь отражает проницаемость плазматических мембран для этого красителя. Таким образом, учитывая присутствие в клеточной суспензии применяемого для седиментации эритроцитов высокомолекулярного непроникающего в клетку полиглюкина, создающего защитный сахарозный каркас вокруг клетки, можно констатировать отсутствие достоверных результатов по оценке жизнеспособности исследуемых клеток методом трипанового синего.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод криоконсервирования ЯСК КК, основанный на применении смеси непроникающего криопротектора ДМСО и непроникающего криопротектора — высокомолекулярного декстрана, разрешенного для внутривенного переливания, и новой четырехэтапной программы замораживания, что позволило снизить эффективную концентрацию ДМСО до 3,5% и минимизировать отрицательное воздействие физико-химических факторов криоконсервирования, сохраняя до 95% ЯСК КК в жизнеспособном состоянии.

2. Оценка жизнеспособности клеток с использованием суправитального красителя трипанового синего не является адекватной, т.к. демонстрирует в большей степени целостность плазматических мембран клеток, не отражая при этом их функциональную жизнеспособность.

ЛИТЕРАТУРА

(в редакции)