Оценка стадий апоптоза и распределения фосфатидилсерина в мембране ядросодержащих клеток пуповинной и периферической крови при различных технологиях криоконсервации

Л.А. Бабийчук, О.А. Михайлова, П.М. Зубов, В.В. Рязанцев
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

Evaluation of apoptosis stages and posphatidylserine distribution in membrane of cord and peripheral blood nucleated cells at various cryopreservation protocols

L.A. Babijchuk, O.O. Mykhailova, P.M. Zubov, V.V. Ryazantsev
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Harkov, Ukraine

Криоконсервация ядросодержащих клеток (ЯСК) пуповинной и периферической крови для последующего применения в клинической практике является единственно возможным способом их долгосрочного хранения. Целью работы была оценка стадий апоптоза и распределения фосфатидилсерина в мембране ЯСК после криоконсервации различными методами. Замораживание фракции ЯСК проводили под защитой криопротекторов различного механизма действия. Было показано, что выделение ЯСК в полиглюкине и последующее их замораживание с использованием криопротектора ДМСО (в конечной концентрации 5%), а также выделение клеток методом двухэтапного центрифугирования с последующим замораживанием с использованием криопротектора полиэтиленоксида (ПЭО, в конечной концентрации 10%), позволяют сохранить неповрежденными большинство клеток пуповинной и периферической крови. Криоконсервация ЯСК, выделенных с использованием фиколла, независимо от используемого криопротектора, приводит к существенному нарушению асимметричного распределения липидов в мембране и значительно снижает количество живых клеток. Установлено, что ЯСК пуповинной крови более устойчивы к повреждающим факторам криоконсервации, чем клетки периферической крови, что проявляется в достоверных отличиях количества живых клеток практически во всех случаях до и после их криоконсервации.

Ключевые слова: ядросодержащие клетки, пуповинная и периферическая кровь, криоконсервация, стадии апоптоза/некроза, липидная асимметрия.

Cryopreservation of cord blood nucleated cells for subsequent application in clinical practice is the only way of their long-term storage. The aim of this study was evaluation of the apoptosis stages and phosphatidylserine distribution in the nucleated cells membrane after cryopreservation by different methods. Nucleated cell fractions were frozen under the protection of the cryoprotectants with different mechanism of action. It was shown that nucleated cells isolation in polyglucin and subsequent freezing under 5% DMSO protection, as well as cells isolation by two-step centrifugation method and subsequent freezing under 10% of polyethyleneoxide (PEO) protection, allowed to keep intact most of the cord and peripheral blood cells. Cryopreservation of nucleated cells isolated using Ficoll, regardless of the used cryoprotectant, leads to significant disruption of the lipids asymmetric distribution in membrane and significantly reduces the number of living cells. It has been found that cord blood nucleated cells more resistant to damaging factors of cryopreservation than peripheral blood cells, that is shown in significant differences between the number of live cells in quite all cases before and after cryopreservation .

Key words: nucleated cells, cord and peripheral blood, cryopreservation, the stages of apoptosis/necrosis, lipid asymmetry.

В последнее время для лечения различных заболеваний системы крови все чаще используют гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), выделенные из пуповинной и периферической крови [1–3]. Широкое применение ГСК, которые входят в состав ядросодержащих клеток (ЯСК), стало предпосылкой к созданию банков крови, где образцы хранятся в жидком азоте или его парах (при -196°С ÷ -150°С) в течение длительного времени без потери их биологических свойств. Имея сложную внутриклеточную организацию, ЯСК крови нуждаются в тщательном подборе технологии криоконсервации, которая позволит сохранить функциональную активность клеток после размораживания [1, 4–6].

Учитывая небольшие объемы пуповинной крови и трудности, связанные с получением ГСК из периферической крови, очень важной задачей является сохранение максимального количества клеток без потери их жизнеспособности и пролиферативной активности после криоконсервации. Это приводит к необходимости разработки новых и усовершенствованию существующих методов криоконсервации клеток [7].

Технология криоконсервации ЯСК крови состоит из нескольких этапов, каждый из которых является принципиально важным. Это связано с тем, что дестабилизация клеток на любом из этапов может привести к потере количества и функциональной активности клеток после криоконсервации и, как следствие, снижению клинической эффективности заготовленного препарата ЯСК. Одним из таких видов повреждения клеток может быть нарушение

e-mail: mixolya@mail.ru

структурно-функциональных свойств их плазматической мембраны, и, прежде всего, изменение трансбислойного распределения липидов, что, в конечном счете, может отразиться на возможности реализации основных функций мембраны, таких как барьерная, транспортная и регуляторная. Нарушение асимметричного распределения фосфолипидов в плазматической мембране, которое сопровождается экстернализацией фосфатидилсерина во внешний монослой [8], служит сигналом для утилизации данных клеток макрофагами.

В то же время, наряду с нарушениями асимметричного распределения липидов, при криоконсервации может происходить нарушение целостности мембран и фрагментация ДНК клеток. Сочетанный анализ данных повреждений позволяет оценить общее состояние клеток в суспензии, а именно определить количество клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза и (или) некроза.

В связи с этим, целью данного исследования была оценка стадий апоптоза и распределения фосфатидилсерина в мембране ядросодержащих клеток пуповинной и периферической крови после криоконсервации различными методами.

Материал и методы

Объект исследования — ЯСК периферической и пуповинной крови человека, заготовленной на глюкозо-цитратном растворе. Пуповинную кровь получали из вены пульсирующей пуповины, после подписания роженицей добровольного информированного согласия.

Процедура криоконсервации ЯСК состоит из нескольких этапов: выделение фракции ЯСК из цельной крови, обработка клеток криопротектором и замораживание-размораживание.

Концентраты ЯСК выделяли несколькими методами: методом седиментации в 3% полиглюкине (ЯСК 1) [9], разработанным нами методом двухэтапного центрифугирования цельной крови с последующим получением концентрата ЯСК в аутоплазме (ЯСК 2) [10] и методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина (ЯСК 3) [11].

В качестве криопротекторов в работе использовали: проникающий в клетку диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 5% и непроникающий (не требующий отмывания после размораживания [12]) полиэтиленоксид с м.м. 1500 (ПЭО) в конечной концентрации 10%, приготовленный на растворе 0,01 М фосфатно-солевого буфера, содержащего 0,15М NaCl, pH 7.4.

Концентрат ЯСК 1 замораживали с использованием 5% ДМСО, концентрат ЯСК 2 — с использованием 10% ПЭО, а концентрат ЯСК 3 замораживали либо с 5% ДМСО, либо с 10% ПЭО.

Затем суспензию клеток переносили в криопробирки объемом 1,8 мл и замораживали до -196°С по специально разработанной двухэтапной программе на программном замораживателе CryoSON [13]. Размораживание осуществляли на водяной бане при 37°С.

Количество ЯСК определяли стандартным методом с помощью камеры Горяева [14]. Сохранность клеток определяли как отношение количества клеток в исследуемом образце (либо после обработки клеток криопротектором, либо после криоконсервации) к количеству клеток после выделения соответствующим методом, выраженное в процентах.

Фенотипирование ядросодержащих ($CD45^+$) клеток, определение степени нарушения асимметричного распределения фосфолипидов в мембране, а также оценку стадий апоптоза клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur с использованием реагентов $CD45^+$, AnnexinV FITC detection KIT I, 7AAD (Becton Dickinson, США). Данные проточной цитометрии оценивали с помощью программного обеспечения CELLQuest Pro (Becton Dickinson, США).

Стадии апоптоза клеток [15] оценивали при одновременном использовании маркера начальной стадии апоптоза, AnnexinV FITC, и витального ДНК-красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD), который проникает в клетки на поздних стадиях апоптоза или некроза, и не проникает в живые клетки с интактной мембраной [16].

AnnexinV — Ca^{2+}-зависимый фосфолипидсвязывающий белок с Мм 35–36 кДа, с высоким сродством к фосфатидилсерину. По связыванию AnnexinV с клетками, характеризующимися наличием на внешней стороне мембраны фосфатидилсерин, который в норме локализован только на внутренней стороне мембраны, можно судить о степени нарушения распределения липидов в бислое.

Данный метод позволяет идентифицировать четыре различных состояния клеток: живые клетки ($AnnexinV^-7AAD^-$-клетки), клетки, находящиеся на начальной стадии апоптоза ($AnnexinV^+7AAD^-$-клетки), мертвые клетки, находящиеся на стадии позднего апоптоза и (или) некроза ($AnnexinV^+7AAD^+$) и мертвые некротические клетки ($AnnexinV^-7AAD^+$)

Данные представлены в виде M±m, статистическую значимость различий между выборками оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с уровнем значимости $p<0,05$. Объем выборки составлял не менее 5 экспериментов.

Результаты и обсуждение

В наших предыдущих работах было показано [9], что после выделения клеток методом седиментации в полиглюкине и двухэтапным центрифугированием (ЯСК 1 и 2) сохранялась высокая жизнеспособность клеток, а изменения асимметричного распределения фосфолипидов в мембране практически не наблюдалось. Однако, при выделении клеток в градиенте плотности фиколла (ЯСК 3) отмечалось значительное снижение жизнеспособности клеток и изменение асимметричного распределения фосфолипидов в мембране.

В настоящее время наиболее широко используемым методом криоконсервации ЯСК пуповинной крови является метод с применением криопротектора ДМСО. В представленном исследовании, кроме данного метода, был применен безотмывочный метод криоконсервации ЯСК с использованием криопротектора ПЭО, эффективность которого была показана при замораживании цельной пуповинной крови [15].

Неотъемлемым параметром оценки эффективности методов криоконсервации является определение количества клеток как до, так и после замораживания-размораживания. Оценка данного параметра показала, что обработка криопротекторами клеток как пуповинной, так и периферической крови практически

не влияла на их сохранность (рис. 1). Однако после этапа криоконсервации сохранность ЯСК 1 и 2 была значительно выше, чем ЯСК 3, независимо от типа использованного криопротектора как в периферической (рис. 1А), так и в пуповинной (рис. 1Б) крови.

Анализ состояния плазматической мембраны ЯСК исследовали методом проточной цитофлуориметрии по связыванию белка AnnexinV с ядросодержащими клетками, который обладает высокоспецифичным сродством к отрицательно заряженным фосфолипидам, в частности к фосфатидилсерину, в норме находящемуся на внутренней поверхности бислоя клеточной мембраны [17].

Проведенные исследования показали, что на этапе обработки клеток криопротекторами в образцах ЯСК 1 и 2 существенных нарушений в распределении фосфатидилсерина не наблюдалось, в отличие от ЯСК 3, где доля AnnexinV$^+$-клеток увеличивалась и была более выражена у ЯСК периферической крови (рис. 1).

Однако после криоконсервации были выявлены значительные нарушения в асимметричном распределении фосфолипидов в мембране, что особенно выражено для всех образцов ЯСК периферической крови, где выход фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны наблюдался у 20-30% клеток, и ЯСК 3 пуповинной крови, где процент AnnexinV$^+$-клеток составлял порядка 15% (рис. 1).

В то же время, ЯСК 1 и 2 пуповинной крови были более устойчивыми к действию повреждающих факторов замораживания-размораживания: после криоконсервации ЯСК 1 доля AnnexinV$^+$-клеток составляла порядка 7%, а у ЯСК 2 – около 10% (рис. 1).

В дальнейших исследованиях был применен метод оценки стадий апоптоза клеток. Было показано, что обработка ЯСК криопротекторами (табл. 1) не приводила к значимому изменению количества клеток, находящихся на различных стадиях апоптоза и (или) некроза, по сравнению с клетками после выделения соответствующими методами.

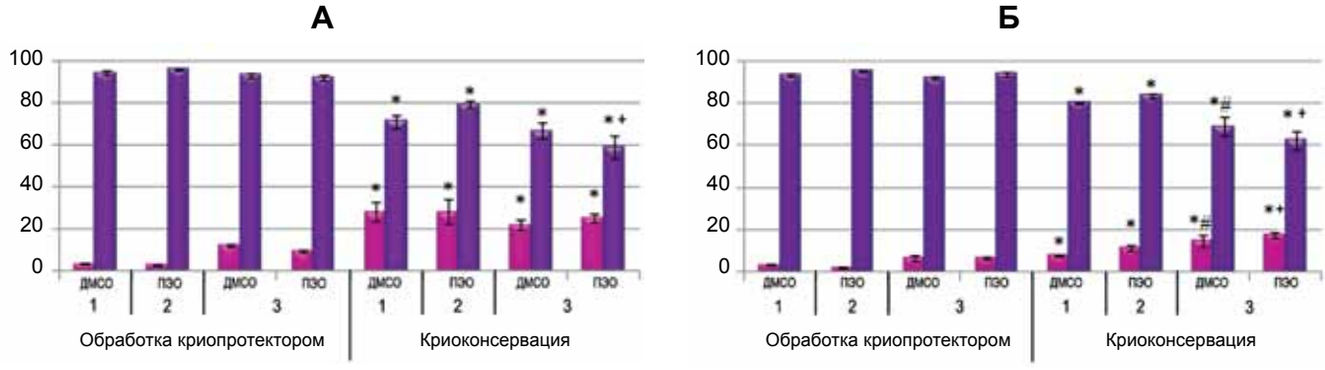

*Рис. 1. Количество жизнеспособных (сиреневый) и AnnexinV–меченных (лиловый) ЯСК периферической (А) и пуповинной (Б) крови после обработки криопротектором и криоконсервации: * – различия от показателей после обработки криопротектором статистически значимы (p<0,05); # – различия показателей с образцами ЯСК 1 после криоконсервации статистически значимы (p<0,05); + – различия показателей с образцами ЯСК 2 после криоконсервации статистически значимы (p<0,05)*

Таблица 1. **Количество клеток, находящихся на различных стадиях апоптоза и (или) некроза в цельной крови, после выделения ЯСК разными методами и после обработки ЯСК криопротекторами, %**

Метод выделения ЯСК	Крио-протектор	Живые клетки		Начальный апоптоз		Поздний апоптоз		Некроз	
		PB	CB	PB	CD	PB	CB	PB	CB
Цельная кровь	–	96,2±0,3	96,8±0,7	1,3±0,2	1,2±0,5	1,2±0,3	0,4±0,2	1,3±0,4	1,6±0,2
ЯСК 1	–	95,7±0,2	95,5±0,2	1,3±0,5	1,7±0,4	1,4±0,4	1,0±0,6	1,6±0,4	1,8±0,4
ЯСК 2	–	96,5±0,1	96,3±0,1	0,6±0,2	1,3±0,3	1,7±0,2	0,9±0,5	1,1±0,3	1,5±0,5
ЯСК 3	–	86,4±0,9	84,6±1,0	4,9±0,9	8,6±1,6	2,2±0,7	0,7±0,3	6,5±0,6	6,1±0,8
ЯСК 1	ДМСО 5%	95,9±0,4	95,1±0,8	1,5±0,3*	2,8±0,5	1,7±0,3*	0,1±0,01	1,0±0,3*	2,0±0,5
ЯСК 2	ПЭО 10%	95,9±0,5*	97,6±0,3	1,5±0,7	1,3±0,2	1,4±0,3*	0,4±0,2	1,2±0,4	0,7±0,3
ЯСК 3	ДМСО 5%	79,6±1,4*	87,5±1,3	8,8±1,5	5,6±0,9	3,4±1,1*	0,6±0,4	8,2±1,0	6,3±1,1
	ПЭО 10%	83,4±1,8*	88,8±1,4	5,2±1,6	4,9±0,8	4,2±1,4*	1,2±0,6	7,1±1,6	5,1±1,3

ЯСК 1, 2, 3 – группы ядросодержащих клеток, полученных различными методами; PB – периферическая кровь; CB – пуповинная кровь; * – различия между показателями периферической и пуповинной крови статистически значимы (p≤0,05).

Необходимо отметить, что существенные отличия между периферической и пуповинной кровью наблюдались только в количестве клеток, находящихся на стадии позднего апоптоза/некроза (AnnexinV$^+$7AAD$^+$). Из табл. 1 следует, что ЯСК периферической крови обладают меньшей устойчивостью к изменениям физико-химических параметров среды в результате их обработки криопротекторами, что проявляется в достоверных отличиях количества живых клеток от таких же показателей пуповинной крови для всех исследуемых образцов, кроме ЯСК 1.

После замораживания-размораживания клеточных суспензий видно, что большая часть ЯСК 1 и ЯСК 2 остаются неповреждеными (табл. 2).

При этом в пуповинной крови данный показатель достоверно выше, чем в периферической, и составляет порядка 80 и 73%, соответственно (рис. 2). Такое высокое количество сохранных (см. рис. 1) и неповрежденных (табл. 2) клеток после замораживания-размораживания может свидетельствовать в пользу состоятельности данных методов криоконсервации.

Таблица 2. **Количество клеток, находящихся на различных стадиях апоптоза и (или) некроза после замораживания-размораживания ЯСК, %**

Метод выделения ЯСК	Криопротектор	Живые клетки		Начальный апоптоз		Поздний апоптоз		Некроз	
		РВ	СВ	РВ	СВ	РВ	СВ	РВ	СВ
ЯСК 1	ДМСО 5%	60,8±5,2*	79,3±1,2	15,7±3,8*	5,2±1,2	12,3±2,5*	2,2±0,9	11,2±2,4	13,4±1,3
ЯСК 2	ПЭО 10%	60,5±4,7*	72,9±2,4	12,6±3,7	7,5±1,8	15,6±3,8*	3,4±1,4	11,4±2,0*	16,2±2,3
ЯСК 3	ДМСО 5%	44,8±1,6*#	56,3±4,3#	15,8±2,8	11,7±2,8	6,0±3,0	2,7±1,2	33,4±3,2	29,2±2,2
	ПЭО 10%	35,6±1,3*+	46,7±3,4$^+$	19,3±2,6*	12,9±2,6	5,9±2,7	4,4±1,8	39,3±2,6	36,0±2,6

ЯСК 1, 2, 3 – группы ядросодержащих клеток, полученные различными методами; РВ – периферическая кровь; СВ – пуповинная кровь; * – различия между показателями периферической и пуповинной крови статистически значимы ($p<0,05$); # – различия показателей с образцами ЯСК 1 статистически значимы ($p<0,05$); + – различия показателей с образцами ЯСК 2 статистически значимы ($p<0,05$).

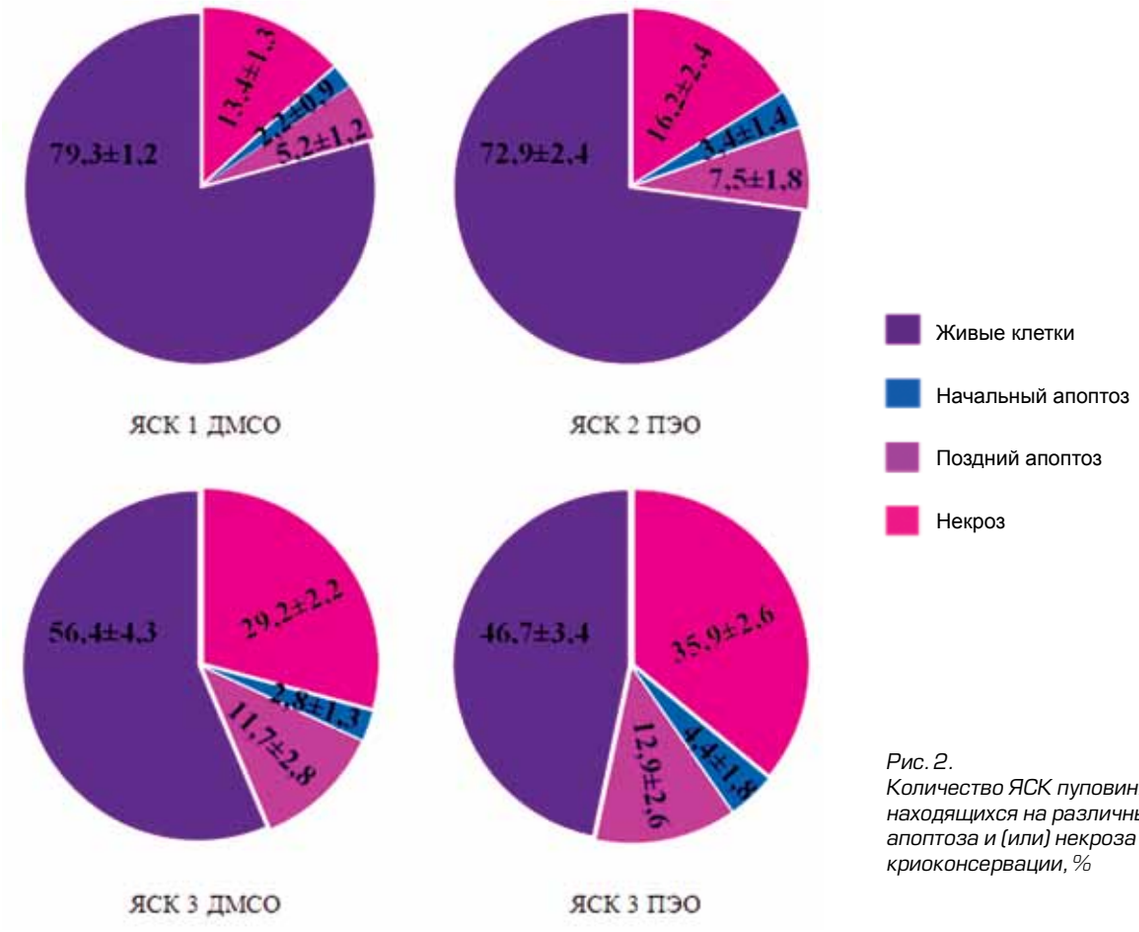

Рис. 2.
Количество ЯСК пуповинной крови, находящихся на различных стадиях апоптоза и (или) некроза после криоконсервации, %

Оценка стадий апоптоза и (или) некроза в клеточных суспензиях, выделенных с использованием фиколла (ЯСК 3), показала, что неповрежденными остаются всего около 50% клеток при замораживании с 5% ДМСО и порядка 40% клеток, замороженных с 10% ПЭО. Такая низкая доля живых клеток в препарате может стать причиной его неэффективности при клиническом применении.

Последующий анализ поврежденных клеток в препаратах показал, что в периферической крови количество ЯСК, находящихся на различных стадиях апоптоза и (или) некроза, менялось в зависимости от метода их выделения. Так, после криоконсервации ЯСК 1 и 2 поврежденные клетки практически равномерно распределялись между исследуемыми зонами апоптоза и (или) некроза. А после криоконсервации ЯСК 3 как с использованием ДМСО, так и ПЭО, более 30% клеток в образцах находилось в зоне некроза, до 20% клеток — на начальной стадии апоптоза, всего около 6% клеток — в состоянии позднего апоптоза и (или) некроза.

Повреждения ЯСК пуповинной крови имели другую направленность: как видно на рис. 2, независимо от метода криоконсервации, большинство поврежденных клеток характеризовалось нарушением целостности мембраны и фрагментацией ДНК при сохранении в ней упорядоченности фосфолипидов, что характерно для стадии некроза. Таким образом, видно, что основные потери клеток происходили в результате их быстрой гибели под влиянием повреждающих факторов замораживания-размораживания, на которые клетки не могли или же не успевали отреагировать с помощью своих защитных систем.

При этом очевидно, что независимо от способа криоконсервации, менее зрелые ЯСК пуповинной крови, обладали большей криоустойчивостью в отличие от более зрелых клеток периферической крови.

Заключение

Проведенные исследования показали, что выделение ЯСК в полиглюкине и последующее их замораживание с использованием 5% ДМСО, а также выделение клеток методом двухэтапного центрифугирования с последующим замораживанием с использованием 10% ПЭО, позволяют сохранить неповрежденными большинство клеток пуповинной и периферической крови.

Криоконсервация ЯСК, выделенных с использованием фиколла, независимо от используемого криопротектора, приводит к существенному нарушению асимметричного распределения липидов в мембране и значительно снижает количество живых клеток.

Установлено, что ЯСК пуповинной крови более устойчивы к повреждающим факторам криоконсервации, чем клетки периферической крови, что проявляется в достоверных отличиях количества живых клеток практически во всех случаях до и после их криоконсервации.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem. PNAS USA 1989; 86: 3828–32.
2. Gluckman E., Broxmeyer H.E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. N. Engl. J. Med. 1989; 321: 1174–8.
3. Siena S., Bregni M., Brando B. et al. Circulation of $CD34^+$ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1989; 74: 1905–14.
4. Бабийчук Л. А., Грищенко В. И., Рязанцев В. В. и др. Новые подходы к проблеме криоконсервирования гемопоэтических клеток пуповинной крови человека. Укр. журнал гематол. і трансфузіол. 2005; 4(д): 122–3.
5. Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., Зайцева О.О. и др. Разработка нового метода сохранения жизнеспособных лейкоцитов в условиях околонулевых температур. Казанский мед. журнал 2008; 4: 558–60.
6. Hubl W., Iturraspe J., Martinez G.A. et al. Measurement of absolute concentration and viability of $CD34^+$ cells in cord blood and cord blood products using fluorescent beads and cyanine nucleic acid dyes. Cytometry 1998; 34: 121–7.
7. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Селиванов Е.А. Наш опыт по заготовке, тестированию и хранению гемопоэтических клеток пуповинной крови. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 3(1): 63–5.
8. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol. 1992; 148(7): 2207–16.
9. Михайлова О.А., Бабийчук Л. А., Рязанцев В. В. и др. Оценка жизнеспособности и степени нарушения асимметрии мембран ядросодержащих клеток при различных методах их выделения из цельной пуповинной и донорской крови. Вісник проблем біології і медицини 2011; 4(90): 118–22.
10. Бабійчук Л.О., Грищенко В.І., Рязанцев В.В. та ін. Пат. 23499 Україна, C12N5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин пуповинної крові / заявник и патентовласник ІПКіК НАН України. Заявл. 2007.01.22.
11. Böyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 1968; 97: 31–50.
12. Бабийчук Л.А., Рязанцев В.В., Зубов П.М. и др. Безотмывочный метод криоконсервирования цельной пуповинной крови. Новое в гематологии и трансфузиологии. Межд. научно-практич. рецензир. сб. 2007; 60–3.
13. Бабійчук Л.О., Грищенко В.І., Гуріна Т.М. та ін. Пат. 92227 Україна, A01N1/02. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин пуповинної крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / заявник и патентовласник ІПКіК НАН України. Заявл. 2008.12.05.
14. Davis J.M., editor. Basic Cell Culture. A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press; 2002.
15. Abrahamsen J.F., Bakken A.M., Bruserud O. et al. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases. Bone Marrow Transplant. 2002; 29(2): 165–71.
16. Philpott N.J., Turner A.J., Scopes J. et al. The use of 7-aminoactinomycin D identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. Blood 1996; 87(6): 2244–51.
17. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood 1994; 84(5): 1415–20.

Поступила 27.09.2013