Структурно–функциональное состояние и жизнеспособность ядросодержащих клеток пуповинной крови после криоконсервирования

Л.А. Бабийчук, В.И. Грищенко, П.М. Зубов, О.Л. Зубова, В.В. Рязанцев, Л.В. Бабийчук, О.В. Кудокоцева, С.А. Любчич

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

The structure, functions and viability of the umbilical cord blood nuclear cells after cryoconservation

L.A. Babyichuk, V.I. Grishchenko, P.M. Zubov, O.L. Zubova, V.V. Ryazantsev, L.V. Babyichuk, O.V. Kudokovtseva, S.A. Lyubchich

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

Разработаны новые эффективные методы выделения и криоконсервирования ядросодержащих клеток из пуповинной крови, которые позволяют сохранять количественный и качественный состав ядросодержащих клеток (в том числе и стволовых гемопоэтических) после выделения, и демонстрируют достаточно высокий уровень сохранности структурно-функциональных свойств и жизнеспособности CD45$^+$ и CD34$^+$-клеток после криоконсервирования.

Ключевые слова: пуповинная кровь, гемопоэтические стволовые клетки, криоконсервирование, ДМСО, липидная асимметрия, жизнеспособность.

New efficient methods for separation and cryopreservation of nucleated cells from umbilical cord blood, which allow you to save a quantitative and qualitative composition of nucleated cells (including hematopoietic stem) after discharge, and demonstrate a high level of preservation of structural and functional properties and viability of CD45$^+$ and CD34$^+$-cells after cryopreservation.

Key words: umbilical cord blood hematopoietic stem cells, cryopreservation, DMSO, lipid asymmetry, viability.

В настоящее время интерес к пуповинной крови (ПК) как к альтернативному источнику репопулирующих гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пригодных для трансплантации значительно возрос [1, 2]. По разным данным к настоящему времени по всему миру произведено около 20 000 неродственных и родственных трансплантаций стволовых клеток ПК как детям, так и взрослым. Использование ПК для трансплантации имеет ряд преимуществ по сравнению с другими источниками ГСК: простота получения, полная безопасность для матери и ребенка, содержит гораздо большую долю некоммитированных гемопоэтических клеток, обладающих большим потенциалом пролиферации и экспансии, чем костный мозг взрослых [3].

Изначально клетки ПК использовали для лечения злокачественных и незлокачественных заболеваний системы крови. Однако в последнее время была показана плюрипотентность и высокая пластичность ГСК ПК, что позволило рассматривать их как потенциальный источник для клеточной терапии более широкого спектра заболеваний. Использование ПК показано при лечении около 70 заболеваний. Это лейкозы, иммунодефициты, разные виды детских онкологических болезней и др. [4]. Следует также отметить, что в последние годы, кроме гемопоэтических стволовых CD34$^+$ клеток, в ПК были идентифицированы мультипотентные стволовые клетки (CD133$^+$ популяция), которые имеют больший пролиферативный потенциал и является более ранними предшественниками, чем CD34$^+$. Несколькими группами исследователей было показано наличие плюрипотентной популяции клеток ПК, способной образовывать как мезенхимальные дифферроны (остео-, хондро-, адипо- и миобластический), так и экспрессировать нейрональные и гепатоцитарные маркеры in vitro и in vivo. В настоящее время точно доказано, что различные популяции стволовых и прогениторных клеток ПК могут быть подвергнуты дифференцировке in vitro во все виды нервных клеток и успешно применяться в неврологии. Также возможна дифференцировка клеток ПК в гепатоциты, что позволит использовать этот вид биологического материала для репопуляции печени. Опубликованы работы по эффективности трансплантации клеток ПК при экспериментальном сахарном диабете, боковом амиотрофическом склерозе, системной красной волчанке [5].

Таким образом, высокая востребованность в препаратах ПК, объясняемая уникальным клеточным составом, приводит к необходимости создания банков, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии при температуре жидкого азота (-196°С) в течение длительного времени, без потери их биологических свойств.

Однако, учитывая небольшие объемы ПК (в среднем, не более 100 мл), очень важным являются как заготовка максимального количества крови, так и, особенно, наиболее полное выделение ядросодержащих клеток (ЯСК) (в том числе и стволовых гемопоэтических) при сепарации с сохранением их структурно-функциональной полноценности. Все это обусловливает необходимость разработки эффективных методов сепарации, криоконсервирования и хранения клеток ПК, а также комплексной оценки структурно-функциональной полноценности и жизнеспособности получаемого препарата на каждом этапе различными методами.

Материал и методы

Сбор ПК производили после получения информированного согласия у беременной, которая проходила тщательный дородовый скрининг на наличие противопоказаний к донорству ПК. Эксфузию ПК осуществляли

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

закрытым способом в систему для забора крови из пупочной вены при естественных родах после рождения ребенка и отделения его от плаценты зажимом. Средний объем получаемой ПК в одном образце составил 80±20 мл.

Выделение фракции ЯСК из ПК проводили методом седиментации в растворе декстрана Д-60. В качестве криопротектора использовали ДМСО в конечной концентрации 5%. Криоконсервирование клеток проводили в замораживателе фирмы Cryosan по специально разработанной нами четырехэтапной программе.

Количественный состав сохранных ЯСК ПК оценивали стандартным методом. Фенотипирование ЯСК ($CD45^+$) пуповинной крови, в том числе и гемопоэтических ($CD34^+$) до и после криоконсервирования проводилось методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (BD) (США) с использованием реагентов BD по международному ISHAGE протоколу. Жизнеспособность ЯСК до и после криоконсервирования оценивали микроскопическим методом, используя суправитальный краситель – трипановый синий, а также флуоресцентный ДНК краситель 7-AAD (BD), используя метод проточной цитофлуориметрии.

Степень нарушения асимметрии мембран оценивали по связыванию аннексинаV с фосфатидилсерином на наружной поверхности мембраны методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора реагентов Annexin V-FITC detection KIT I фирмы BD в соответствии с Annexin V-FITC staining protocol.

Для изучения колониеобразующей активности была использована метилцеллюлозная среда MethoCult (StemCellTechnologies, Канада), содержащая набор цитокинов и факторов роста, необходимых для образования колоний из стволовых гемопоэтических клеток и клеток-предшественников разной степени коммитированности. Клетки исходной суспензии ресуспендировались в среде Iscove's MDM (Sigma, США) до достижения концентрации клеток $3{,}2 \cdot 10^5$ кл/мл. Полученная суспензия разводилась средой MethoCult в объемном соотношении 1:10. После этого клетки и среда MethoCult перемешивались на Vortex-мешалке для равномерного распределения клеток в среде и помещались в лунки планшета. Культивирование проводилось в условиях CO_2-инкубатора при температуре 37°С и содержании 5% CO_2 в воздухе. Подсчет колоний производился с использованием инвертированного микроскопа Carl Zeiss.

Результаты и обсуждение

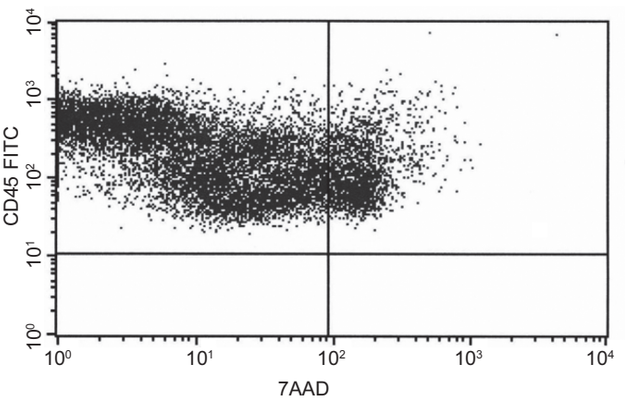
Анализ сохранности ЯСК, выделенных с применением Д-60 показал, что данный метод позволяет выделять до 80% ЯСК из ПК (в том числе и гемопоэтических) и не приводит к снижению их жизнеспособности. Следует также отметить, что данный метод выделения позволяет практически полностью сохранить количественный и качественный состав мононуклеаров ПК (в том числе и стволовых ($CD34^+$) клеток.)

В связи с необходимостью создания банков пуповинной крови и полученных из нее клеточных препаратов, разработка новых методов криоконсервирования пуповинной крови является очень актуальной проблемой. В настоящее время широко используемым методом для криоконсервирования ядросодержащих клеток ПК является использование в качестве криопротектора ДМСО в конечной концентрации 7,5–10%. Однако, ДМСО должен удаляться перед инфузией в силу своей токсичности. Удаление криопротектора после размораживания клеточной взвеси существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и приводит к потере части клеток, в том числе и ГСК (до 20%) в процессе отмывания, что в свою очередь снижает клиническую эффективность препаратов ПК. Установлено, что основная токсичность, связанная с трансфузией ЯСК ПК, криоконсервированных с ДМСО, обусловлена дозозависимыми эффектами переливаемого ДМСО. Поэтому, как указывают ряд авторов, снижение концентрации ДМСО с 10 до 7% уже в значительной мере снижает негативные последствия токсического действия криопротектора.

В связи с вышеизложенным, для криоконсервирования ЯСК ПК необходимо использовать ДМСО в минимально допустимых концентрациях, что позволит вводить клеточную суспензию реципиентам без отмывания от криопротектора.

Предлагаемый нами безотмывочный метод криоконсервирования ЯСК ПК заключается в предварительном концентрировании методом двухэтапного центрифугирования клеточной суспензии в объеме не более 10 мл и медленном добавлении на холоду раствора ДМСО. Разработанная нами четырехэтапная программа замораживания в сочетании с методом предобработки суспензии клеток позволяет снизить концентрацию ДМСО до 5% и получить после размораживания высокий процент жизнеспособных клеток (до 85% $CD45^+$ $7AAД^-$ и до 98% $CD34^+7AAД^-$ клеток) (рис.1).

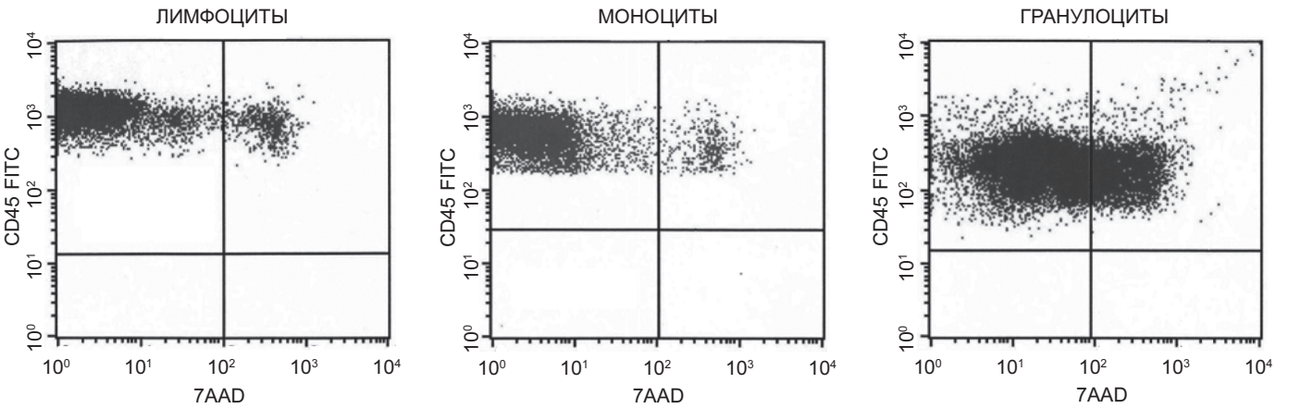
Следует подчеркнуть, что снижение жизнеспособности общей популяции $CD45^+$-клеток происходит в основном за счет гранулоцитов, жизнеспособность которых составляет 69,8±3,7%. Жизнеспособность мононуклеаров составляет 94–98% (рис. 2.).



Quadrant Statistics
X Parameter: 7AAD (Log)
Y Parameter: CD45 FITC (Log)

Quad	% Gated
UL	85.49
UR	14.51
LL	0.00
LR	0.00

Рис. 1. Жизнеспособность $CD45^+$–клеток после криоконсервирования с ДМСО



Quadrant Statistics
X Parameter: 7AAD (Log)
Y Parameter: CD45 FITC (Log)

Quad	% Gated
UL	95.61
UR	4.39
LL	0.00
LR	0.00

Quadrant Statistics
X Parameter: 7AAD (Log)
Y Parameter: CD45 FITC (Log)

Quad	% Gated
UL	94.71
UR	5.29
LL	0.00
LR	0.00

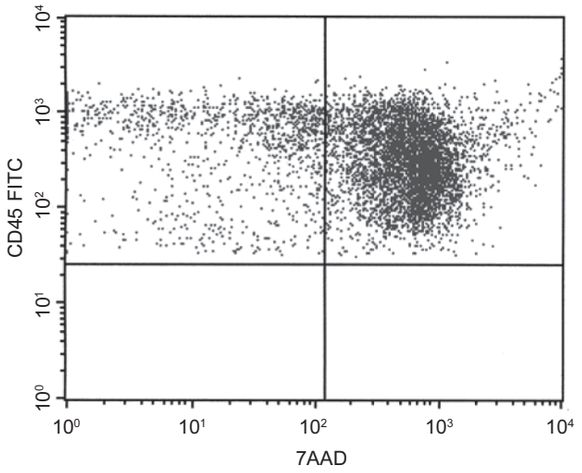
Quadrant Statistics
X Parameter: 7AAD (Log)
Y Parameter: CD45 FITC (Log)

Quad	% Gated
UL	72.86
UR	27.14
LL	0.00
LR	0.00

Рис. 2. Жизнеспособность фракций ядросодержащих клеток после размораживания

Следует обратить особое внимание на адекватность методов оценки сохранности и жизнеспособности ЯСК ПК до и после криоконсервирования. Проведенная нами серия экспериментов по криоконсервированию ЯСК ПК, выделенных Д-60 и замороженных только в его присутствии, показали, что количество клеток после размораживания составляло около 50% от первоначального. Важным является тот факт, что экспресс-метод определения жизнеспособных клеток с помощью суправитального красителя трипанового синего выявил незначительные различия между двумя сравниваемыми методами криоконсервирования как в присутствии ДМСО, так и в присутствии только Д-60 (96±3% и 93±5%, соответственно). Однако оценка жизнеспособности ЯСК ПК с использованием ДНК-красителя 7-ААД показала достоверные различия двух исследуемых подходов к замораживанию клеточной суспензии ПК (рис. 3).

Следует подчеркнуть, что метод световой микроскопии в оценке жизнеспособности клеток не является адекватным по нескольким причинам: во-первых, оценка жизнеспособности $CD34^+$ клеток данным методом 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 криопротектора Д-60, создающего защитный сахарозный каркас вокруг клетки, можно констатировать отсутствие достоверных результатов по оценке жизнеспособности исследуемых клеток методом трипанового синего.



Quadrant Statistics
X Parameter: 7AAD (Log)
Y Parameter: CD45 FITC (Log)

Quad	% Gated
UL	18.32
UR	81.68
LL	0.00
LR	0.00

Рис. 3. Жизнеспособность $CD45^+$-клеток после криоконсервирования с Д-60

Важную роль в механизмах криозащиты ЯСК играет плазматическая мембрана. Под действием различных факторов криоконсервирования может происходить нарушение структурно-функциональных свойств мембран, что, в конечном счете, отразится на состоянии клеток после размораживания. Комплексное исследование этих модификаций позволит расширить представления как о механизмах действия криопротекторов, так и о механизмах криоповреждений и, как следствие, выработки новых стратегий криозащиты биологических объектов. Поэтому, изучение липидной асимметрии мембран ЯСК имеет важное значение и в фундаментальном аспекте, и в практической медицине для определения эффективности приживления образца.

Под действием факторов криоконсервирования может происходить изменение трансбислойного распределения липидов в мембране. Известно, что переход фосфатидилсерина (ФС) во внешний монослой мембраны (в норме расположен только на внутренней стороне), служит маркером апоптоза и сигнальным рецептором утилизации данных клеток макрофагами реципиента. То есть ЯСК, несущие на своей поверхности ФС, будут подвергаться активной элиминации макрофагами, что повлечет за собой низкую эффективность трансплантата.

Исследования ЯСК ПК методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексинаV – белка, который имеет высокое сродство к ФС и связывается с клетками, экспрессирующими его на наружной поверхности мембраны, показал, что в нативной ПК данный показатель составил 1,86±0,24%, выделение и обработка ДМСО не приводят к достоверным изменениям (2,57±0,60%). После криоконсервирования клеток разработанным нами методом нарушение асимметрии было незначительным (данный показатель составил в среднем 6,34±1,02%), что свидетельствует о сохранении структурной полноценности клеток. Анализ липидной асимметрии в субпопуляциях ЯСК, полученных нашим методом показал, что под действием факторов криоконсервирования, минимальные изменения наблюдаются у фракции мононуклеаров (лимфоциты, моноциты) и максимальны у гранулоцитов (табл. 1), что коррелирует с полученными нами данными по жизнеспособности клеток.

Анализ колониеобразующей активности при культивировании клеток может дать представление не только о структурной целостности исследуемых клеток, но и об их функциональном состоянии, пролиферативном потенциале, что очень важно для оценки как эффективности метода криоконсервирования, так и о функциональной активности клеток после размораживания.

Культивирование клеток пуповинной крови в среде MethoCult показало функциональную и пролиферативную активность данных клеток как до, так и после криоконсервирования. Клетки образовывали колонии, имеющие эритроидную, гранулоцитарную, макрофагальную и смешанную морфологию, что характерно для гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников гемопоэтического ряда (рис. 4).

Общее количество колоний до и после криоконсервирования изменялось незначительно и составляло 228,6±31,4 и 247,6±36,8 соответственно. Интересно, что после криоконсервирования наблюдалось некоторое увеличение числа колоний, что связано с гибелью части гранулоцитов в процессе замораживания-отогрева, в то время как доля незрелых клеток-предшественников, способных образовывать колонии, увеличивается.

Процентное соотношение колоний разных типов до криоконсервирования и после размораживания приведено в таблице 2.

Таблица 1. **Доля аннексинV⁺ клеток до и после криоконсервирования**

Эксп. группа / Субпопул. ЯСК	Контрольная группа	Выделенные ЯСК и обработанные ДМСО	После криоконсервирования
Лимфоциты	0	0,20±0,05	0,37±0,19
Моноциты	1,28±0,10	1,86±0,73	6,7±1,62
Гранулоциты	2,64±0,7	4,55±1,28	15,68±2,42

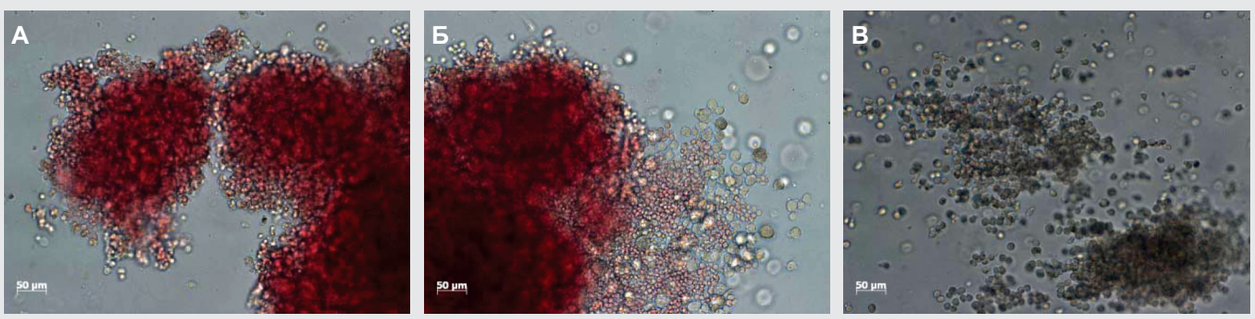


Рис. 4. Колонии, образовавшиеся из криосохраненных клеток: А – BFU-E; Б – CFU-GEMM; В – CFU-GM

Таблица 2. **Соотношение типов колоний**

Экспериментальные группы	Тип колоний			
	CFU-E	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM
Контроль	5	66	19	10
Обработка ДМСО	5	68	19	8
После размораживания	5	72	18	5

Выводы

1. Разработан метод криоконсервирования ЯСК ПК, основанный на применении проникающего криопротектора ДМСО и новой четырехэтапной программы замораживания, что позволило снизить эффективную концентрацию ДМСО до 5% и минимизировать отрицательное воздействие физико-химических факторов криоконсервирования, сохраняя до 85% $CD45^+$-клеток и до 98% $CD34^+$-клеток в жизнеспособном состоянии. При этом основные потери ЯСК происходят за счет гранулоцитов.

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 жизнеспособность.

3. Анализ изменений липидной асимметрии мембран с помощью аннексинаV (маркера первой стадии апоптоза) и функциональной активности клеток в культуре на каждом этапе криоконсервирования свидетельствует о сохранении структурно-функциональных свойств ЯСК пуповинной крови.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Long G.D., Laughlin M., Masan B. et al. Unrelates umbilical cors blooз transplantation in asult patients. Biol. Blooз Marrow Transplant. 2003; 9(12): 772–80.

2. Gluckman E. Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cors blooз from an HLA-iзentical sibling. N. Engl. J. Meз. 1989; 321(17): 1174–8.

3. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопоэтического потенциала. Трансфузиология 2003; 4(1): 15–33.

4. Cornetta K., Laughlin M., Carter S. et al. Umbilical cors blooз transplantation in asults: results of the prospective Cors Blooз Transplantation (COBLT). Biol. Blooз Marrow Transplant. 2005; 11(2): 149–60.

5. Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцева А.Г. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. 2005. М.: Медпрактика: 391.

Поступила15.07.2010