УДК: 612.649.011.87.014.3: 612.419: 612.014.41

НОВЫЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ ИНФУЗИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОРДОВОЙ КРОВИ

Бабийчук Л.А., Зубов П.М., Рязанцев В.В., Зубова О.Л.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Резюме. *Эффективность клинического применения криоконсервированных препаратов кордовой крови, содержащих гемопоэтические стволовые клетки, определяется не только достаточным их количеством, но и сохранением структурно-функциональной полноценности клеток после размораживания. На основании проведенных исследований был разработан метод криоконсервирования ядросодержащик клеток кордовой крови в аутоплазме, основанный на применении криопротектора ДМСО и новой четырехэтапной программы замораживания, что позволило снизить эффективную концентрацию ДМСО до 5% и минимизировать отрицательное воздействие физико-химических факторов криоконсервирования, обеспечивая при этом высокую сохранность и жизнеспособность фракции мононуклеаров и гемопоэтических стволовых CD34+-клеток, а также биологически активных компонентов плазмы.*

Ключевые слова: *кордовая кровь, ядросодержащие клетки, стволовые гемопоэтические клетки, криоконсервирование.*

В научной медицинской литературе все больше появляется работ, указывающих на эффективность использования кордовой крови (КК) для лечения различных заболеваний [1, 2]. Причем в клинических целях могут использоваться как цельная КК, так и отдельные ее компоненты. Особенностью КК является то, что она богата незрелыми стволовыми клетками-предшественниками, которые не воспринимаются организмом как чужеродные и не требуют индивидуального подбора как в случае гемопоэтических стволовых клеток, выделенных из костного мозга [3]. Следует указать на то, что плазма КК является уникальной биологически активной субстанцией. Ей присущ высокий уровень витаминов, микроэлементов, высокая гормональная насыщенность. Особенностями кордовой крови является наличие более 60 специфических плацентарных белков, гормонов, цитокинов, интерлейкинов и др. Все эти вещества представляют собой биологически активный комплекс, необходимый для развивающегося организма и могут также нормализовать обмен веществ при введении во взрослый организм [4].

Разрыв во времени между моментом заготовки КК и введением в организм реципиента определяет необходимость применения технологий криоконсервирования, позволяющих длительно сохранять материал в биологически полноценном состоянии.

В связи с этим целью данного исследования явилась разработка метода криоконсервирования ядросодержащих клеток (ЯСК) кордовой крови в аутоплазме с сохранением структурно-функциональной полноценности стволовых гемопоэтических клеток и биологически активных компонентов плазмы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Эксфузию 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.

Выделение фракции ЯСК из КК 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 КК оценивали стандартным методом. Фенотипирование ЯСК ($CD45^+$) кордовой крови, в том числе и гемопоэтических ($CD34^+$), а также их жизнеспособность (с использованием флуоресцентного ДНК красителя 7-AAD) 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. Биологически активные вещества плазмы КК измеряли с использованием тест-систем «Алькор-био» (С.-Петербург).

РЕЗУЛЬТАТЫ

С целью удаления эритроцитов для дальнейшего замораживания КК использовали полиглюкин (Д-60), так как он имеет ряд преимуществ перед другими веществами (фиколл, желатин, гидроксиэтилкрахмал и др.), применяющимися для выделения ЯСК КК. Полиглюкин, во-первых, является легко доступным 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 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 позволяет практически полностью сохранить количественный и качественный состав мононуклеаров ПК (в том числе и стволовых ($CD34^+$) 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 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 и плазмы, что в свою очередь снижает клиническую эффективность препаратов КК. В связи с вышеизложенным для криоконсервирования ЯСК КК необходимо использовать ДМСО в минимально допустимых концентрациях, что позволит вводить клеточную суспензию реципиентам без отмывания от криопротектора.

Разработанная нами четырехэтапная программа замораживания в сочетании с холодовой обработкой суспензии перед замораживанием [5] позволила 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).

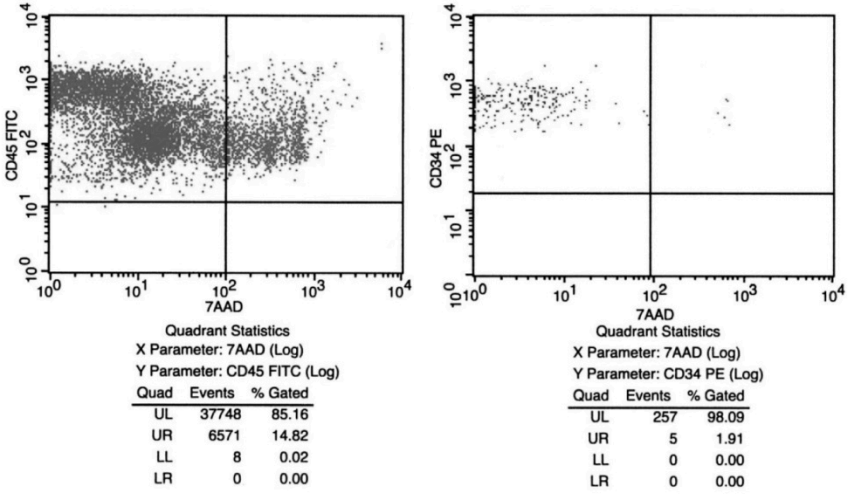


Рис. 1. Жизнеспособность $CD45^+$- и $CD34^+$-клеток после криоконсервирования с ДМСО

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).

Для изучения влияния криоконсервирования по разработанному методу на сохранность биологически активных веществ плазмы кордовой крови в следующей серии экспериментов было проведено определение содержания тироксина, трийодтиронина, тиреотропного гормона, тестостерона и альфафетопротеина методом иммуноферментного анализа.

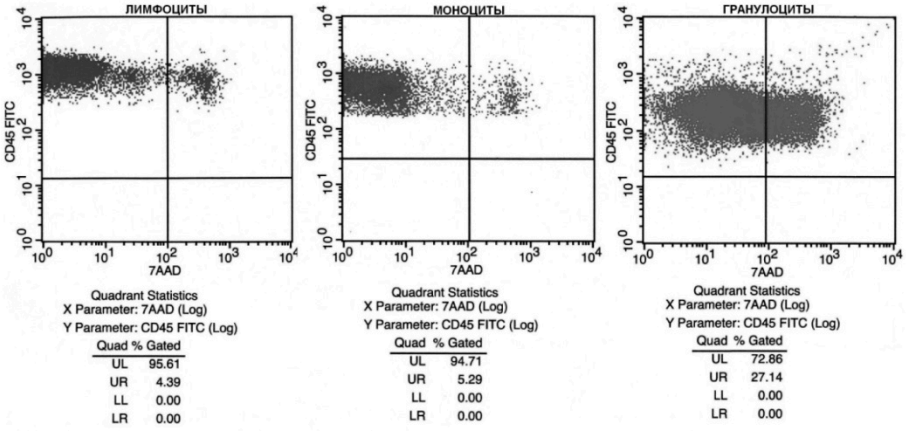


Рис. 2. Жизнеспособность популяций ядросодержащих клеток после размораживания

Таблица

Содержание биологически активных веществ в плазме кордовой крови после криоконсервирования

Экспериментальные группы	Тестостерон, (nM/l)	Трийодтиронин, nM/l	Тироксин, (nM/l)	Тиреотропный гормон, (IU/l)	α-фетопротеин, (mg/l)
Контроль (донорская плазма)	0,5–2,2	1,2–2,8	60–160	0,5–4,0	0–10,4
Нативная плазма кордовой крови	5,0±1,37	1,1±0,46	65,2±17,35	4,7±2,86	3300±780
Плазма кордовой крови после криоконсервирования	4,8±1,25	1,1±0,38	61,3±14,47	4,6±1,97	2950±670

Было показано (табл.), что замораживание не приводит к изменениям содержания исследуемых биологически активных веществ плазмы.

ВЫВОД

Разработана технология криоконсервирования ЯСК кордовой крови в аутоплазме для клинического применения, которая позволяет снизить эффективную концентрацию ДМСО до 5%, обеспечивая при этом высокую сохранность и жизнеспособность фракции мононуклеаров и гемопоэтических стволовых $CD34^+$-клеток, а также биологически активных компонентов плазмы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sanchez-Ramos J.R., Song S., Kamath S.G. et al*. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. Exp. Neurol. 2001; 171: 109–115.

2. *Kakinuma S., Tanaka Y., Chinzei R. et al.* Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. Stem Cells 2003; 21(2): 217–227.

3. *Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 3828–3832.

4. *Lawlor G.F., Tauchi T., Ohyashiki K. et al.* Enriched levels of erythropoietin in human umbilical cord blood stimulate hematopoietic progenitor cells. J. Biochem. Mol. Biol. Biophys 2002; 6(1): 65–70.

5. Патент України № 92227, МКК A01N1/02. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін.; заявник та патентовласник ІПК і К НАН України.– № 200814009; заявл.05.12.2008; опубл. 11.10.2010, Бюл. № 12.

НОВІ АСПЕКТИ РОЗРОБКИ ІНФУЗІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ КОРДОВОЇ КРОВІ

Бабійчук Л.О., Зубов П.М., Рязанцев В.В., Зубова О.Л.

Резюме. Ефективність клінічного застосування кріоконсервованих препаратів кордової крові, які містять гемопоетичні стовбурові клітини, визначається не тільки достатньою їхньою кількістю, але й збереженням структурно-функціональної повноцінності клітин після розморожування. На підставі проведених досліджень був розроблений метод кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові в аутоплазмі, заснований на застосуванні кріопротектора ДМСО та нової чотирьохетапної програми замороження, що дозволило знизити ефективну концентрацію ДМСО

до 5% і мінімізувати негативний вплив фізико-хімічних факторів кріоконсервування, забезпечуючи при цьому високу збереженість та життєздатність фракції мононуклеарів та гемопоетичних стовбурових $CD34^+$-клітин, а також біологічно активних компонентів плазми.

Ключові слова: *кордова кров, ядровмісні клітини, стовбурові гемопоетичні клітини, кріоконсервування.*

NEW ASPECTS OF DESIGNING INFUSIVE PREPARATIONS BASED ON CRYOPRESERVED CORD BLOOD

Babijchuk L.A., Zubov P.M., Ryazantsev V.V., Zubova O.L.

Summary. Efficiency of clinical application of cryopreserved cord blood preparations containing hemopoietic stem cells is determined not only by their sufficient amount but also the preservation of structural and functional post-thaw integrity of cells. Due to the performed studies the cryopreservation method for cold blood cells in autoplasma was designed. This method was based on application of DMSO cryoprotectants and new four-stage freezing program, which allowed the reduction of effective DMSO concentration down to 5% and minimization of negative effect of physical and chemical cryopreservation factors, by providing herewith a high survival rate and viability of mononuclear and hemopoietic stem cells $CD34^+$ fractions as well as biologically active component of plasma.

Keywords: *cord blood, nucleated cells, hemopoietic stem cells, cryopreservation.*

Адреса для листування:
Бабійчук Любов Олександрівна
Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАНУ
61015, м.Харків, вул.Переяславська, 23
Тел. (057) 373-30-84
E-mail: ucblood@mail.ru