

УДК: 57.043:577.1:577.325.45

Вплив методів сепарації та режимів криоконсервування на структурно-функціональні властивості ядромісних клітин кордової крові П.М.Зубов

*Институт проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків, Україна)
pmzubov@mail.ru*

У роботі проведено оцінку ефективності технологій криоконсервування кордової крові з використанням криопротекторів різного механізму дії. Продемонстрована залежність збереженості та життєздатності ядромісних клітин кордової крові, у тому числі гемопоетичних стовбурових, а також структурної повноцінності їх мембран від методів виділення та режимів криоконсервування. Показано, що застосування непроникаючого криопротектора поліетиленоксиду з Mw 1500 у кінцевій концентрації 10% або проникаючого ДМСО у кінцевій концентрації 5% забезпечують високу збереженість структурно-функціональних параметрів клітин після розморожування.

Ключові слова: *кордова кров, ядромісні клітини, гемопоетичні стовбурові клітини, криопротектори, криоконсервування.*

Влияние методов сепарации и режимов криоконсервирования на структурно-функциональные свойства ядросодержащих клеток кордовой крови П.М.Зубов

В работе проведена оценка эффективности технологий криоконсервирования кордовой крови с использованием криопротекторов разного механизма действия. Продемонстрирована зависимость сохранности и жизнеспособности ядросодержащих клеток кордовой крови, в том числе гемопоэтических стволовых, а также структурной полноценности их мембран от методов выделения и режимов криоконсервирования. Показано, что использование непроникающего криопротектора полиэтиленоксида с Mw 1500 в конечной концентрации 10% или проникающего ДМСО в конечной концентрации 5% обеспечивает высокую сохранность структурно-функциональных параметров клеток после размораживания.

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

Effect of separation techniques and regimes of cryopreservation on the structural and functional properties of cord blood nucleated cells P.M.Zubov

In this paper the effectiveness of cryopreservation technology of cord blood using different cryoprotectants mechanism of action was assessed. The dependence of cord blood nucleated cells, including hematopoietic stem cells, safety viability and structural membrane integrity on the methods of their isolation and cryopreservation regimes was demonstrated. It has been shown that the application of non-penetrating cryoprotectant PEO-1500 (final concentration of 10%) or penetrating DMSO (final concentration of 5%) provide the preservation of cell structure and functional parameters after thawing.

Key words: *cord blood, nucleated cells, hemopoietic stem cells, cryoprotectants, cryopreservation.*

Вступ

За останні два десятиріччя кордова кров (КК) визнана в якості повноцінного й рівноправного джерела гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) поряд з кістковим мозком та мобілізованою периферичною кров'ю (Broxmeyer, 1995; Gluckman, 1998). Кордова кров є абсолютно безпечним, технічно легко одержуваним джерелом ГСК, які мають високий проліферативний потенціал та ефективно використовуються для лікування цілого ряду захворювань (Cornetta et al., 2005).

Широке використання кордової крові можливе лише за наявності її запасів, що вимагає розробки нових і вдосконалення існуючих технологій криоконсервування. У зв'язку з необхідністю

створення банків, розробка ефективних методів сепарації та заморожування, а також комплексне дослідження впливу фізико-хімічних факторів кріоконсервування на ядровмісні клітини (ЯВК) кордової крові, у тому числі й стовбурові гемопоетичні, на кожному етапі технологічного процесу кріоконсервування є актуальною проблемою кріобіології. Успішність вирішення цього завдання напряду залежить від різнобічного вивчення процесів, що призводять до загибелі клітин на різних етапах кріоконсервування, дозволяє виявити критичні точки порушень структурних компонентів і вести цілеспрямований підбір умов для стабілізації біологічних об'єктів. Вирішення цієї задачі повинно забезпечити максимальне збереження структурно-функціональної повноцінності всіх популяцій клітин як на етапі сепарації з цільної кордової крові, так і, особливо, після обробки кріопротекторами та заморожування-відігрівання (Lagoche V et al., 2005).

У зв'язку з цим метою даної роботи було вивчення впливу методів виділення, режимів обробки кріопротекторами різного механізму дії та кріоконсервування на структурно-функціональні властивості та життєздатність ядровмісних клітин, виділених з кордової крові людини.

Об'єкти та методи дослідження

Об'єкт дослідження: ядровмісні, у тому числі стовбурові гемопоетичні, клітини кордової крові людини. Використовувалася кордова кров людини, отримана з вени пуповини після нормальних пологів при наявності інформованої згоди породіллі. Матеріал заготовлювали на консерванті «Глюгіцир».

Виділення фракції ЯВК проводили наступними методами:

1. Метод центрифугування в градієнті щільності фікол-верографіну (метод 1) (Абдулкадыров, Романенко, 2003);

2. Метод седиментації в поліглюкіні (ПГ) (метод 2) (Абдулкадыров, Романенко, 2003);

3. Розроблений нами спеціальний метод двохетапного центрифугування цільної крові з наступним одержанням концентрату ЯВК в аутоплазмі (метод 3) (Бабійчук та ін., 2007).

Обробку кріопротекторами проводили за наступною схемою:

- клітини, виділені методом 1, обробляли ДМСО або поліетиленоксидом з Мв 1500 (ПЕО-1500) до кінцевих концентрацій 5% та 10% відповідно;

- клітини, виділені методом 2, обробляли ДМСО до кінцевої концентрації 5%;

- клітини, виділені методом 3, обробляли ПЕО-1500 до кінцевої концентрації 10%.

Кріоконсервування проводили за спеціально розробленими програмами для проникаючих (Бабійчук та ін., 2010) та непроникаючих (Бабійчук та ін., 2013) кріопротекторів.

Визначення абсолютної кількості клітин проводили в камері Горяєва згідно до стандартної методики. Визначення фенотипу CD45⁺ та CD34⁺-клітин, а також їх життєздатності здійснювали методом проточної цитофлуориметрії за стандартним ISHAGE протоколом. Для цього використовували FITC-мічений CD45 клон 2D1; PE-мічений CD34 клон 8G12, а також вітальний барвник 7-AAD. Проби аналізували на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (США). Для мінімізації похибки збір даних проводився до моменту накопичення не менш ніж 200 CD34⁺-клітин. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення фірми BD – CELLQuest Pro. Ступінь порушення асиметрії мембрани оцінювали за зв'язуванням анексину V з фосфатидилсерином на зовнішній поверхні мембрани ЯВК методом проточної цитофлуориметрії з використанням набору Annexin V-FITC detection KIT I фірми BD відповідно до Annexin V-FITC staining protocol. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення CELLQuest Pro.

Статистичну обробку даних проводили параметричним методом Стьюдента-Фішера з використанням t-критерію. Для розрахунків використовували комп'ютерну програму "Stat Graphics". Кількість експериментів у кожній серії дослідів була не менше п'яти.

Результати та обговорення

З огляду на невеликий відсоток стовбурових клітин в одній дозі КК, дуже важливим завданням на підготовчих етапах перед кріоконсервуванням є як заготівля максимально можливої кількості крові, так і, що особливо важливо, найбільш повне виділення ЯВК (у тому числі й ГСК) при сепарації зі збереженням якості клітин. Процедура сепарації ЯВК із цільної крові проводять з метою мінімізації об'ємів суспензії клітин, які закладаються на зберігання в кріосховища, а також для запобігання розвитку гемолітичної реакції при трансфузії клітинної суспензії, несумісної за еритроцитарними

антигенами (А, В, 0, резус та ін.), а також негативного впливу лізату еритроцитів на організм реципієнта, що має місце при повільних швидкостях заморожування.

Аналіз збереженості ЯВК, виділених із застосуванням різних методів, показав (табл. 1), що сепарація в градієнті щільності фікол-верографіну, у порівнянні з іншими методами, поступається як за ефективністю виділення ЯВК, так і ГСК, що співпадає з літературними даними (Cornetta et al., 2005).

Слід акцентуватися на тому, що визначення збереженості клітин є важливим, але недостатнім тестом. У зв'язку із цим нами був проведений аналіз життєздатності ядромісних, у тому числі й стовбурових гемопоетичних клітин кордової крові.

Таблиця 1.

Характеристики препаратів кордової крові, виділених різними методами

	Відсоток виділених клітин CD45 ⁺	Відсоток виділених клітин CD34 ⁺
Цільна КК	100	100
Метод 1	54,8±5,1*	64,1±8,2*
Метод 2	83,2±4,1	81,3±4,6
Метод 3	95,1±3,7	91,2±5,9

Примітки: дані представлені у відсотках, у вигляді $M \pm SE$; * – результати відрізняються від методів 2 та 3 з рівнем $p < 0,05$.

Сучасні підходи до визначення життєздатності клітин засновані на використанні методу проточної цитофлуориметрії із застосуванням флуоресцентних барвників, які не проникають у клітини з неушкодженими мембранами або активним метаболізмом. Клітини ж з ушкодженими плазматичними мембранами або з ослабленим метаболізмом не здатні запобігти проникненню барвників. Потрапивши в клітину, барвники зв'язуються із внутрішньоклітинними структурами, що призводить до утворення високофлуоресцентних аддуктів, які ідентифікують клітину як «нежиттєздатну».

У своїй роботі ми визначали життєздатність клітин за допомогою вітального барвника 7-аміноактиноміцину D (7AAD), який є аналогом актиноміцину D і зв'язується із цитозинними та гуаніновими основами ДНК. При цьому даний барвник проникає в клітини, які перебувають на пізній стадії апоптозу/некрозу та мають порушення в цілісності мембрани, у той час як клітини з неушкодженою плазматичною мембраною для нього не доступні.

Аналіз життєздатності ЯВК показав (рис. 1), що зниження життєздатності клітин, виділених як методом 2 так і методом 3, не спостерігається, на відміну від клітин, виділених у градієнті щільності фіколу (метод 1), де вже на етапі після сепарації спостерігається втрата життєздатності ЯВК (7,6±2,4% CD45⁺7AAD⁻-клітин та 10,6±4,2% CD34⁺7AAD⁻-клітин).

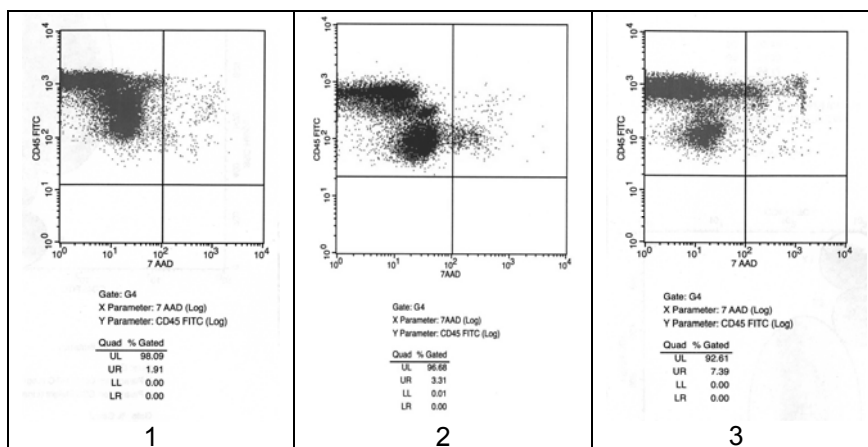


Рис. 1. Цитограми життєздатності ЯВК КК залежно від методу виділення в координатах CD45 FITC/ 7-AAD (дані типового експерименту)

Примітки: 1 – цільна КК; 2 – клітини, виділені методом двохетапного центрифугування; 3 – клітини, виділені в градієнті щільності фікол-верографіну.

Таким чином, методи виділення ЯВК як за допомогою поліглюкіну, так і методом подвійного центрифугування дозволяють зберігати кількісний і, що особливо важливо, якісний склад мононуклеарів КК (у тому числі й стовбурових CD34⁺-клітин). Ці дані мають важливе значення для наступних етапів кріоконсервування, тому що відомо, що стан клітин на етапі перед кріоконсервуванням багато в чому визначає результати заморожування-відігрівання. Тому значна дестабілізація клітин при виділенні фіколом призведе до того, що кріоконсервуванню будуть піддаватися заздалегідь ушкоджені клітини. Це обов'язково проявиться як у зниженні їх стійкості, так і у втраті життєздатності на етапах обробки кріопротектором і заморожування-відігрівання.

Існуючі на даний час технології кріоконсервування ЯВК як кісткового мозку, так і кордової крові не дозволяють зберігати повною мірою всі її клітинні компоненти, оскільки використовуваний проникаючий кріопротектор ДМСО у кінцевій концентрації 10% вимагає серії відмивань після розморожування, що призводить до втрат клітин. Тому максимальне збереження всіх клітинних компонентів можливе лише при використанні безвідмивних технологій із застосуванням непроникаючих кріопротекторів або проникаючих (як-то ДМСО), у мінімальних концентраціях, які не потребують відмивання.

У наших попередніх роботах було показано, що серед різних непроникаючих кріопротекторів найбільш ефективним для кріозахисту ядромісних клітин кордової крові людини є ПЕО-1500 у кінцевій концентрації 10%. При цьому максимальна збереженість спостерігалася при дозованому додаванні кріопротектора при низькій позитивній температурі (0–4°C) (Бабийчук и др., 2005, Зубов, 2013).

Таким чином, у наступній серії експериментів обробку кріопротекторами проводили за схемами, які зазначені вище. Всі ці варіанти експериментальних груп після обробки відповідними кріопротекторами заморожували за спеціальними, розробленими нами, програмами.

Проведені експерименти показали, що процес додавання кріопротекторів, а також кріоконсервування призводять до зниження збереженості клітин в усіх експериментальних групах (табл. 2).

Таблиця 2.
Збереженість і життєздатність ЯВК, після обробки кріопротекторами та кріоконсервування

Експериментальні групи	Збереженість CD45 ⁺ -клітин	Збереженість CD34 ⁺ -клітин	Життєздатність CD45 ⁺ -клітин	Життєздатність CD34 ⁺ -клітин
Обробка кріопротектором				
Метод 1 (5% ДМСО)	94,3±2,7	95,8±1,8	91,2±3,1	92,1±1,7
Метод 1 (10% ПЕО-1500)	89,4±1,8	90,5±2,7	92,4±1,8	94,2±3,5
Метод 2 (5% ДМСО)	93,6±0,8	92,7±1,7	97,8±1,7	97,5±1,4
Метод 3 (10% ПЕО-1500)	85,9±2,2	87,8±2,7	98,2±0,8	98,2±1,1
Після заморожування-відігрівання				
Метод 1 (5% ДМСО)	69,2±4,6	59,1±5,6*	52,4±4,2*	46,2±4,1*
Метод 1 (10% ПЕО-1500)	62,6±4,5*	63,8±5,2*	61,4±2,1*	54,7±3,8*
Метод 2 (5% ДМСО)	81,2±3,7	89,2±4,1	82,7±2,9	93,5±2,9
Метод 3 (10% ПЕО-1500)	72,3±3,9	75,8±3,9	83,1±1,7	91,2±3,4

*Примітки: дані представлені у відсотках, у вигляді M±SE; * – результати відрізняються від методів 2 та 3 з рівнем p<0,05.*

Як видно з таблиці, розроблена нами програма заморожування в комбінації із запропонованим методом передобробки суспензії клітин дозволяє знизити ефективну концентрацію ДМСО до 5% і одержати після розморожування високий відсоток збережених клітин (табл. 2). Збереженість CD45⁺- і CD34⁺-клітин, виділених фіколом та заморожених аналогічним чином, складала 69,2±4,6% і 59,1±5,6% відповідно. Це може вказувати на явний дестабілізуючий ефект даної хімічної сполуки на ЯВК. Слід зазначити, що життєздатність CD45⁺- та CD45⁺CD34⁺-клітин, виділених ПГ та кріоконсервованих нашим методом, також була значно вищою у порівнянні з клітинами, виділеними фіколом та замороженими за аналогічною програмою (табл. 2).

Слід також вказати на те, що ЯВК, виділені методом двохетапного центрифугування, заморожені з ПЕО-1500 у кінцевій концентрації 10%, зберігаються після розморожування до 75% і до 82% CD34⁺-клітин. При цьому життєздатність становить у CD45⁺-клітин до 85%, а CD34⁺ – до 95% (табл. 2).

Важливу роль у механізмах криозахисту ЯВК відіграє плазматична мембрана. Процес сепарації ЯВК як з використанням хімічних сполук, так і без них, а також обробка криопротекторами та процедура заморожування-відігрівання буде позначатися на її структурно-функціональній повноцінності. Відомо, що під дією різних факторів криоконсервування може відбуватися зміна трансбішарового розташування ліпідів у мембрані. Відомо, що перехід фосфатидилсерину (ФС) у зовнішній моношар мембрани (у нормі розташований лише у внутрішньому моношарі), є маркером початкової стадії апоптозу й сигнальним рецептором утилізації даних клітин макрофагами реципієнта (Krahling et al., 1999). Тобто, ЯВК, що несуть на своїй поверхні ФС, будуть піддаватися активній елімінації макрофагами, що спричинить низьку ефективність препарату при застосуванні. Саме тому вивчення ліпідної асиметрії мембран ЯВК має важливе значення як у фундаментальному аспекті, так і в практичній медицині. У зв'язку з цим у наступній серії експериментів було проведено оцінку порушення ліпідної асиметрії ЯВК на кожному етапі криоконсервування.

Дослідження ЯВК КК методом проточної цитофлуориметрії з використанням анексину V – білку, що має високу спорідненість до ФС і зв'язується з клітинами, які експресують його на зовнішній поверхні мембрани, показав (табл. 3), що для нативної КК даний показник складає 1,8±0,57%, виділення ЯВК з цільної КК методами 2 та 3, обробка криопротектором та криоконсервування не викликають значних змін у асиметричному розподілі ФС у мембрані, на відміну від методу виділення в градієнті щільності фікол-верографіну, де спостерігається значна кількість клітин з експресованим на їх зовнішній поверхні фосфатидилсериніом вже на етапі отримання концентрату ЯВК (табл. 3, рис. 2).

Таблиця 3.

Кількість алексин V⁺-клітин в популяціях ядровмісних клітин, виділених та криоконсервованих різними методами

Умови експерименту	CD45 ⁺ AnnexinV ⁺
Цільна КК	1,8±0,57
Виділення ЯВК з цільної КК	
Метод 1	9,2±2,7*
Метод 2	2,7±0,4
Метод 3	1,9±0,2
Обробка криопротектором	
Метод 1 (5% ДМСО)	9,2±2,6*
Метод 1 (10% ПЕО-1500)	7,1±1,9*
Метод 2 (5% ДМСО)	2,9±0,6
Метод 3 (10% ПЕО-1500)	1,7±0,4
Після заморожування-відігрівання	
Метод 1 (5% ДМСО)	24,5±5,1*
Метод 1 (10% ПЕО-1500)	26,3±2,8*
Метод 2 (5% ДМСО)	7,3±2,4
Метод 3 (10% ПЕО-1500)	10,9±2,9

Примітки: дані представлені у відсотках, у вигляді M±SE; * – результати відрізняються від методів 2 та 3 з рівнем p<0,05.

Ці зміни значною мірою посилюються після криоконсервування (табл. 3).

Слід зазначити, що після криоконсервування клітин розробленими методами 2 і 3 порушення асиметрії складало в середньому 7,3±2,4% і 10,9±2,9, що свідчить про збереження структурної повноцінності мембран у значній кількості клітин.

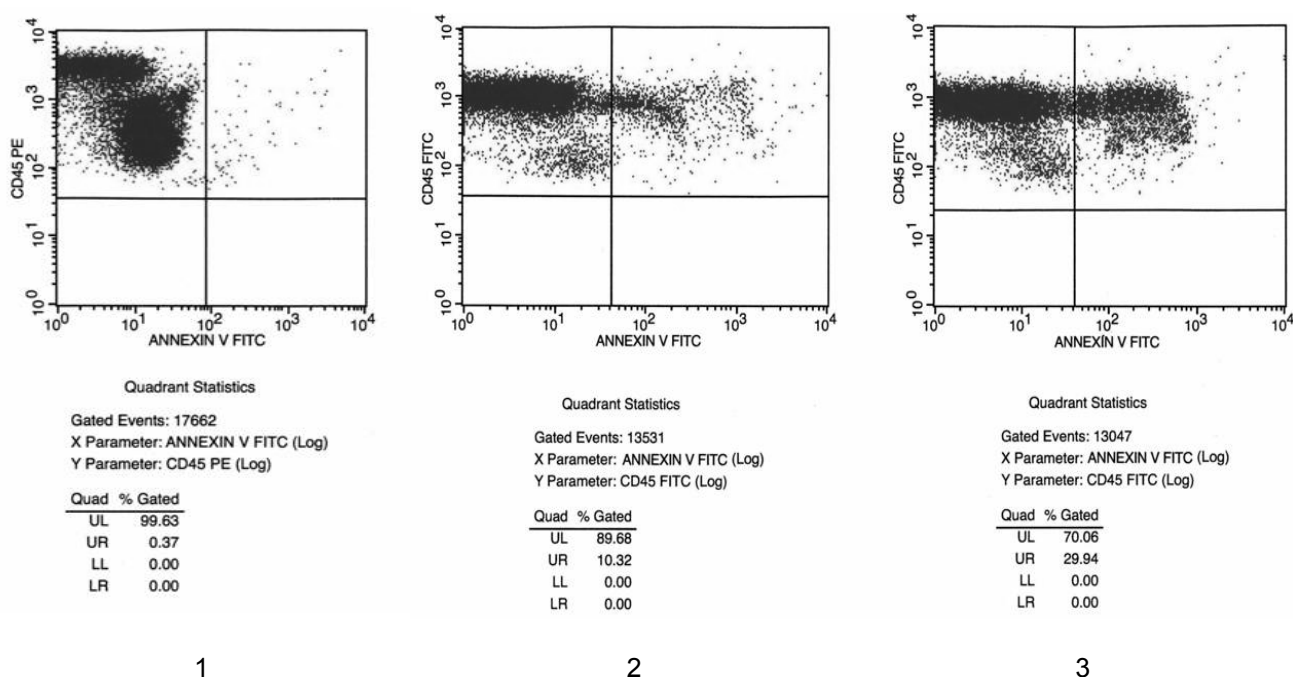


Рис. 2. Порухення асиметрії мембран ЯВК, виділених фікол-верографіном до та після кріоконсервування з 10% ПЕО-1500 (дані типового експерименту)

Примітки: 1 – цільна КК; 2 – концентрат ЯВК; 3 – після розморожування.

Таким чином, оцінка структурної повноцінності мембран дозволяє зробити висновок, що запропоновані нами методи виділення та кріоконсервування дають значно кращі результати, в той час як виділення загальноприйнятим методом в градієнті щільності фікол-верографіну призводить до значних змін структурно-функціонального стану клітин вже на етапі сепарації, що у значній мірі позначається на успішності кріоконсервування суспензії клітин.

Список літератури

- Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопоэтического потенциала // Трансфузиология. – 2003. – Т.4, №1. – С. 15–33. /Abdulkadyrov K.M., Romanenko N.A. Zagotovka platsentarnoy krovi. Osobennosti yeye kletochnogo sostava i gemopoeticheskogo potentsiala // Transfuziologiya. – 2003. – Т.4, №1. – С. 15–33./
- Бабійчук Л.А., Рязанцев В.В., Зубов П.М. и др. Новые методы кріоконсервирования кордовой крови человека под защитой непроницающего криопротектора полиэтиленоксида м.м. 1500 // Проблемы кріобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С. 556–560. /Babiychuk L.A., Ryazantsev V.V., Zubov P.M. i dr. Novyye metody krikonservirovaniya kordovoy krovi cheloveka pod zashchitoy nepronikayushchego krioprotektora polietilenoksida m.m. 1500 // Problemy kriobiologii. – 2005. – Т.15, №3. – С. 556–560./
- Бабійчук Л.О., Грищенко В.І., Гуріна Т.М. та ін. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин. Пат. України №92227, МПК А01N 1/02. з.№200814009. Заявл. 05.12.2008. Опубл. 11.10.2010. – Бюл. №19. /Babiychuk L.O., Grishchenko V.I., Gurina T.M. ta in. Sposib krikonservuvannya yadrovmisnykh klityn kordovoi krovi, u tomu chysli stovburovykh gemopoetychnykh klityn. Pat. Ukrainy № 92227, МПК А01N 1/02. z.№200814009. Zayavl. 05.12.2008. Opubl. 11.10.2010. – Byul. №19./
- Бабійчук Л.О., Грищенко В.І., Рязанцев В.В. та ін. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові. Пат. України №23499, МПК С 12 N 5/00. № 200700585. Заявл. 22.01.07. Опубл. 25.05.07. – Бюл. №7. /Babiychuk L.O., Grishchenko V.I., Ryazantsev V.V. ta in. Sposib vydilennya yadrovmisnykh klityn kordovoi krovi. Pat. Ukrainy №23499, МПК S 12 N 5/00. № 200700585. Zayavl. 22.01.07. Opubl. 25.05.07. – Byul. №7./
- Бабійчук Л.О., Гуріна Т.М., Зубов П.М та ін. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі гемопоетичних стовбурових клітин. Пат. України №83734, МПК А01N 1/02. №201304364. Заявл. 08.04.2013. Опубл. 25.09.2013. – Бюл. №18. /Babiychuk L.O., Gurina T.M., Zubov P.M ta in.

Sposib kriokonservuvannya yadrovnisnykh klityn kordovoi krovi, u tomu chysli gemopoetychnykh stoburovykh klityn. Pat. Ukrainy №83734, МРК А01N 1/02. №201304364. Zayavl. 08.04.2013. Opubl. 25.09.2013. – Byul. №18./

Зубов П.М. Влияние непроникающего криопротектора ПЭО-1500 на структурно-функциональные свойства ядросодержащих клеток кордовой крови до и после криоконсервирования // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2013. – №3 (20). – С. 14–17. /Zubov P.M. Vliyaniye nepronikayushchego krioprotektora PEO-1500 na strukturno-funktsional'nyye svoystva yadrosoderzhashchikh kletok kordovoy krovi do i posle kriokonservirovaniya // Ukrains'kyi zhurnal gematologii ta transfuziologii. – 2013. – №3 (20). – S. 14–17./

Broxmeyer H.E. Cord blood as an alternative source for stem and progenitor cell transplantation // Current. Opinion. in Pediatrics. – 1995. – №7. – P. 47–55.

Cornetta K., Laughlin M., Carter S. et al. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation // Biol. Blood Marrow Transpl. – 2005. – Vol.11, №2. – P. 149–160.

Gluckman E. Sources of haemopoietic stem cells for allogeneic transplantation // Blood and Marrow Transplantation: The EBMT Handbook. – Craddock. ESH.EBMT, 1998. – P. 88–96.

Krahling S., Callahan M.K., Williamson P., Schlegel R.A. Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages // Cell Death Differ. – 1999. – Vol.6. – P. 183–189.

Laroche V., McKenna D.H., Moroff G. et al. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples // Transfusion. – 2005. – Vol.45, №12. – P. 1909–1916.

Представлено: Н.Г.Малова / Presented by: N.G.Malova

Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 15.05.2014