

УДК 611-018.5.013.8:615.014.41

© Коллектив авторов, 2012.

ОЦЕНКА СТАДИЙ АПОПТОЗА ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Л.А. Бабийчук, П.М. Zubov, О.А. Михайлова, В.В. Рязанцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, отдел криоцитологии и количественной морфологии, проф. Л.А. Бабийчук; г. Харьков.

ASSESSMENT OF APOPTOSIS STAGES OF CORD BLOOD NUCLEATED CELLS PRIOR TO AND AFTER CRYOPRESERVATION

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

SUMMARY

This study assessed the stages of apoptosis in cord blood nucleated cells prior to and after cryopreservation by means of different methods. It was shown that the method of separation of nucleated cells using dextran (m.m. 60000) and subsequent freezing with 5% DMSO, as well as cells separation by a two-step centrifugation with following freezing with 10% PEG-1500 allowed keeping the maximum amount of "absolutely" viable (AnnexinV-7AAD-) nucleated cells. It was shown that the major cell loss during cryopreservation occurred at the freezing-thawing stage, and were characterized, first of all, a disturbance of the membrane integrity and fragmentation of nuclear DNA of cells.

ОЦІНКА СТАДІЙ АПОПТОЗУ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ДО ТА ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Л.О. Бабійчук, П.М. Zubov, О.О. Михайлова, В.В. Рязанцев

РЕЗЮМЕ

У даному дослідженні була проведена оцінка стадій апоптозу ядровісних клітин кордової крові до і після кріоконсервування різними методами. Було показано, що метод виділення ядровісних клітин з використанням поліглюкіна і подальше їх заморожування під захистом 5% ДМСО, а також їх виділення методом двохетапного центрифугування з подальшим заморожуванням під захистом 10% ПЕО-1500, дозволяють зберегти максимальну кількість «абсолютно» живих (AnnexinV-7AAD-) ядровісних клітин. Встановлено, що основні втрати клітин у процесі кріоконсервування відбуваються на етапі заморожування-відігрівання, і характеризуються, в першу чергу, порушенням цілісності мембрани і фрагментацією ядерної ДНК клітин.

Ключевые слова: ядросодержащие клетки, кордовая кровь, криоконсервирование, стадии апоптоза.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) кордовой крови (КК) на сегодняшний день является важным компонентом лечения многих гематологических заболеваний. Это привело к необходимости создания банков, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии в течение длительного времени без потери биологических свойств.

Учитывая небольшие объемы КК и невозможность ее повторного сбора, на передний план выступает необходимость сохранения максимального количества ядросодержащих клеток (ЯСК), в состав которых входят и ГСК, без потери их пролиферативной активности и жизнеспособности. В связи с этим постоянно разрабатываются новые и усовершенствуются имеющиеся методы их криоконсервирования [1].

Технология криоконсервирования ЯСК КК состоит из нескольких этапов, каждый из которых является принципиально важным. Так, дестабилизация клеток на этапе их выделения из цельной КК или обработки криопротектором может привести к развитию необратимых повреждений и, как следствие, гибели клеток по пути апоптоза. Также, во время замораживания, клетки могут гибнуть по

пути некроза, в результате их повреждения кристаллами льда. В связи с этим, анализ состояния ЯСК должен проводится на каждом этапе их криоконсервирования. В противном случае, потеря количества и функциональной активности клеток после криоконсервирования может привести к несостоятельности заготовленного препарата ЯСК и/или неэффективности его клинического применения [2].

Таким образом, целью данного исследования была оценка стадий апоптоза ядросодержащих клеток кордовой крови до и после криоконсервирования различными методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили ядросодержащие клетки кордовой крови человека, заготовленной на глюкозо-цитратном растворе. Кордовую кровь получали из вены пуповины, после получения информационного согласия у роженицы.

Выделение концентратов (CONC) ЯСК проводили несколькими методами, в частности, широко используемым в мировой практике методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина (CONC 2) [6], и разработанными нами

методами седиментации в 3% полиглюкине (CONC 1) и двухэтапным центрифугированием цельной крови с последующим получением концентрата ЯСК в аутоплазме (CONC 3) [3]. В качестве криопротекторов в работе использовали диметилсульфоксид (ДМСО) (в конечной концентрации 5%) и полиэтиленоксид с м.м. 1500 (ПЭО-1500) (в конечной концентрации 10%), приготовленный на растворе 0,01 М фосфатно-солевого буфера, содержащего 0,15М NaCl, pH 7.4. Концентрат ЯСК CONC 1 (полиглюкин) замораживали как под защитой 5% ДМСО, так и без данного криопротектора. Концентрат ЯСК CONC 2 (фиколл) замораживали с использованием двух криопротекторов - 5% ДМСО и 10% ПЭО-1500. Криоконсервирование ЯСК, полученных двухэтапным центрифугированием (CONC 3), проводили под защитой 10% ПЭО-1500. Добавление криопротекторов к суспензии клеток проводили дозировано, при низкой положительной температуре (2-4 °С), 1:1 по объему [1]. Замораживание проводили до -196°С по специально разработанной двухэтапной программе на программном замораживателе CryoSON [4]. Оттаивание осуществляли при 37°С на водяной бане при постоянном покачивании.

Определение фенотипа ядросодержащих (CD45⁺) клеток, а также оценку стадий апоптоза клеток с использованием 7-аминоактиномицина D (7AAD) и Annexin V-FITC, проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (США) с использованием реагентов BD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, любое внешнее воздействие на клетки (физическое, химическое или сочетанное) может негативно сказываться на их состоянии и приводить к возникновению различного рода повреждений. Одним из таких повреждений может быть нарушение целостности мембран и фрагментация ДНК клеток, которое можно оценить с использованием витального красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD) [9]. Другим видом повреждения клеток может быть нарушение 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 [7], служит сигнальным рецептором утилизации данных клеток макрофагами. Данные нарушения возможно выявить методом проточной

цитофлуориметрии по связыванию AnnexinV с ядросодержащими клетками (AnnexinV⁺-клетки), который обладает высокоспецифичным сродством к отрицательно заряженным фосфолипидам, в частности к фосфатидилсерину [8].

Для более детального исследования состояния ЯСК КК в процессе криоконсервирования нами был применен метод оценки стадий апоптоза клеток, основанный на использовании комбинации AnnexinV с окрашиванием витальным красителем 7AAD, который легко проникает в клетки на поздних стадиях апоптоза или некроза, и не проникает в живые клетки с интактной мембраной. Данный метод позволяет идентифицировать четыре различных типа клеток (рис.1) [6].

Было показано (рис. 2), что выделение ЯСК с использованием полиглюкина или двухэтапным центрифугированием (CONC 1 и 3) не влияет на состояние клеток в концентратах, по сравнению с цельной КК. При данных методах выделения ЯСК общее количество живых (AnnexinV⁺7AAD⁻-клеток) составляет более 95%.

При этом, после выделения концентрата ЯСК фиколлом (CONC 2) наблюдается (рис. 2) увеличение относительного содержания как мертвых некротических клеток (AnnexinV⁺7AAD⁺), так и клеток, находящиеся на начальной стадии апоптоза (AnnexinV⁺7AAD⁻). Такое повреждение клеток может быть связано с особенностями данного метода выделения, сочетающего в себе одновременное воздействие жестких физических и химических факторов.

Последующая обработка концентратов ЯСК криопротекторами, не зависимо от природы их действия на клетку, не приводила к существенным изменениям состояния клеток в концентратах.

Оценка состояния клеток после замораживания-отогрева концентратов ЯСК, показала (рис. 2), что самое высокое содержание «абсолютно» живых (AnnexinV⁺7AAD⁻) клеток наблюдается после их выделения с помощью полиглюкина (CONC 1) и замораживания под защитой 5% ДМСО (79,3±1,2%), а также после выделения клеток методом двухэтапного центрифугирования (CONC 3) и замораживания с 10% ПЭО-1500 (72,9±2,4%).

В тоже время, выделение ЯСК с использованием фиколла (CONC 2) и их последующее замораживание как с 5% ДМСО, так и с 10% ПЭО-1500, снижало количество AnnexinV⁺7AAD⁻-клеток до 56,3±4,3% и 46,7±3,4% соответственно. Такое низкое количество «абсолютно» живых клеток может быть следствием их дестабилизации на этапе выделения с использованием фиколла.

Концентрат ЯСК, выделенный с использованием полиглюкина (CONC 1) и замороженный без внесения в среду криоконсервирования дополнительного проникающего криопротектора ДМСО,

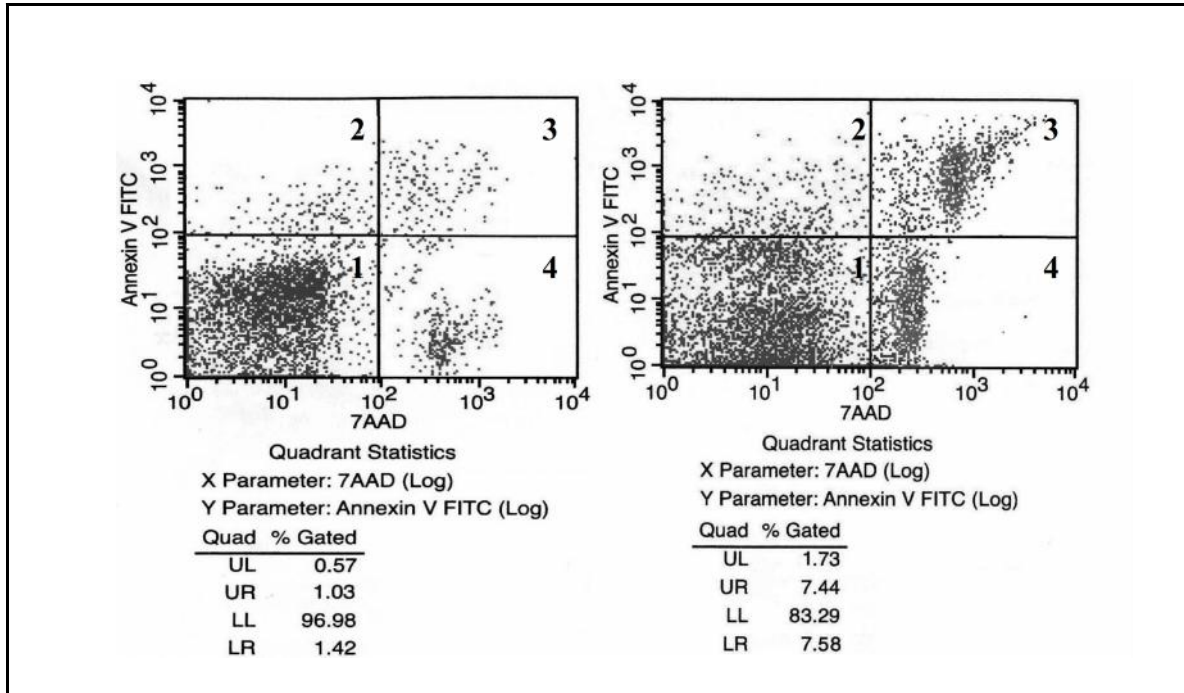


Рис. 1. Цитограммы ЯСК кордовой крови, выделенные с помощью полиглобулина до (А) и после криоконсервирования с 5% ДМСО (Б): 1 – «абсолютно» живые клетки (AnnexinV-7AAD-клетки), 2 - клетки находящиеся на начальной стадии апоптоза (AnnexinV⁺7AAD⁻-клетки), 3 - мертвые клетки, находящиеся на стадии позднего апоптоза/некроза (AnnexinV⁺7AAD⁺) и 4 - мертвые некротические клетки (AnnexinV-7AAD⁺). Данные типичного эксперимента.

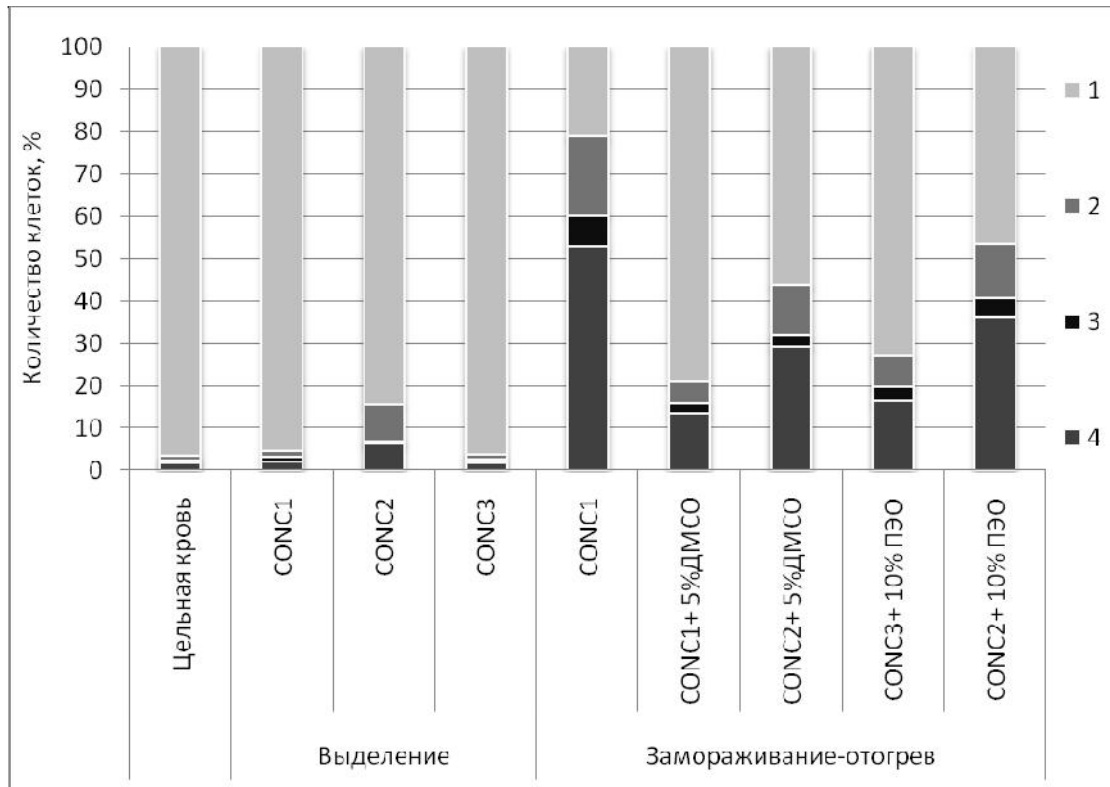


Рис. 2. Стадии апоптоза ЯСК до и после криоконсервирования: 1 - живые клетки (AnnexinV-7AAD-клетки), 2 - клетки находящиеся на начальной стадии апоптоза (AnnexinV⁺7AAD⁻-клетки), 3 - клетки, находящиеся на стадии позднего апоптоза/некроза (AnnexinV⁺7AAD⁺), 4 - мертвые некротические клетки (AnnexinV-7AAD⁺).

характеризовался самым низким процентом живых клеток – $21,3 \pm 8,2\%$ AnnexinV-7AAD⁻-клеток. Такой низкий процент живых клеток после криоконсервирования свидетельствует о несостоятельности данного препарата и невозможности его применения в клинической практике.

При анализе тех клеток, которые имеют те или иные повреждения, видно (рис. 2), что независимо от метода криоконсервирования, большая их часть (около 2/3) характеризуется нарушением целостности мембраны и фрагментацией ДНК в ядре при сохранении в ней упорядоченности липидов, что характерно для клеток, находящихся на стадии некроза (AnnexinV-7AAD⁻). Т.е., видно, что в процессе криоконсервирования основные потери клеток происходят в результате их быстрой гибели под влиянием повреждающих факторов замораживания-отогрева, на которые клетки не могут или же не успевают отреагировать с помощью своих защитных систем. Клеток, находящихся на начальной стадии апоптоза (AnnexinV⁺7AAD⁻), гораздо меньше. И небольшой процент, из всех поврежденных в процессе криоконсервирования ЯСК, составляют клетки, которые находятся на поздней стадии апоптоза/некроза (AnnexinV⁺7AAD⁺), т.е. клетки, которые имеют нарушения целостности плазматической мембраны и упорядоченности в ней фосфолипидов.

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что метод выделения ядросодержащих клеток с использованием полиглюкина и последующее их замораживание под защитой 5% ДМСО, а так же выделение ЯСК методом двухэтапного центрифугирования с последующим замораживанием под защитой 10% ПЭО-1500, позволяют сохранить максимальное количество «абсолютно» живых (AnnexinV-7AAD⁻) ядросодержащих клеток. Установлено, что основные потери клеток в процессе криоконсервирования происходят на этапе замораживания-отогрева, и характеризуются, в первую очередь, нарушением целостности мембраны и фрагментацией ядерной ДНК клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабийчук Л. А., Грищенко В. И., Рязанцев В. В. и др. Новые подходы к проблеме криоконсервирования гемопоэтических клеток кордовой крови человека // Укр. журн. гематол. і трансфузіол.– 2005.– № 4(д).– С.122–123.
2. 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 кордовой и донорской крови // Вісник проблем біології і медицини.- 2011.- Вип.4(90).- С.118-122.
3. Пат. 23499 Україна, МПК С 12 N 5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові / Л. А. Бабийчук, В. И. Грищенко, В. В. Рязанцев, П. М. Зубов, О. Л. Зубова; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – №200700585; заявл. 22.01.07; опубл. 25.05.07, Бюл. №7.
4. Пат. 92227 Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / Л.О. Бабийчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – №200814009; заявл. 05.12.2008; опубл. 11.10.2010, Бюл.№19, 2010.
5. 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.- Vol.29.- P.165-171.
6. Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents // Scand J Clin Lab Invest Suppl.– 1968.– Vol.97.– P. 31–50.
7. 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.- Vol.148.- P.2207-2216.
8. 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.- Vol.84.- P. 1415-1420.
9. 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.- Vol. 87.- P.2244-2251.