

Жизнеспособность и дифференцировка костного мозга гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток, криоконсервированных при -196°C с 1972 года

С. СУМИДА, Т. КИТАМУРА, Н. МОТОМУРА, А. САЙТО

Клиника и лаборатория криомедицины и переливания крови д-ра Саджио Сумиды
Тканевой банк, Отделение сердечно-сосудистой хирургии, Факультет медицины Токийского
Университета

Viability and Differentiation of Bone Marrow Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Cryopreserved at -196°C since 1972

S. SUMIDA, T. KITAMURA, N. MOTOMURA, A. SAITO

Dr. Sajio Sumida Clinic and Lab Cryomedicine and Blood Transfusion
Tissue Bank, Department of Cardiovascular Surgery, Tokyo University School of Medicine, Japan

Это исследование было проведено для подтверждения жизнеспособности и дифференцировки в культуре деконсервированных клеток костного мозга, клеток пуповины и лимфоцитов периферической крови, криоконсервированных с 1972 года в течение 30–40 лет.

Аутологичные клетки костного мозга в количестве $5,1 \pm 2,9 \times 10^{6-9}$ были собраны для лечения 293 больных с распространенным солидным раком перед химиотерапией. Эти клетки суспендировали в 15%-м (конечная концентрация) растворе глицерина в тканевой культуральной среде 199 (в 1972–1980 гг.) или в 10%-м (конечная концентрация) растворе ДМСО на основе аутологичной плазмы в тefлоновом/каптоновом контейнере, охлаждали до $-75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ со скоростью 2–5 град/мин с использованием программного замораживателя и хранили в жидком азоте 30–40 лет при температуре -196°C , начиная с 1972 года. Контейнеры с клетками костного мозга, которые не использовали для лечения пациентов, постоянно хранятся в хранилище с жидким азотом до сегодняшнего дня. В 2010 году часть образцов была разморожена для изучения жизнеспособности и дифференцировки гемопоэтических (ГСК) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Размороженные клетки культивировали в чашках Петри с культуральной средой и соответствующими факторами роста: сыворотками взрослого человека и/или лизатом клеток крови мечехвоста в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 . Культуральная среда заменялась регулярно, два-три раза в неделю.

Исследования показали: что моноцитарные и эритробластные КОЕ были обнаружены в 96% деконсервированных клеток костного мозга. Восстановление ГСК деконсервированного костного мозга (15 марта 2012 года) соответствует уравнению регрессии: $Y = -0,0003X + 0,0367$, т. е. замораживание в жидком азоте мало влияет на количество восстановленных КОЕ-С клеток костного мозга. Повышенная экспрессия поверхностных маркеров: CD2, 4, 11b, 13, 16, 33, 38, HLA-DR и GP означает, что именно факторы роста в средах эффективно стимулируют пролиферацию и дифференцировку этих клеток для экспрессирования поверхностных маркеров. Некоторые колонии клеток, образованные на 5–7 день культивирования, сохранялись до 3 месяцев (4–6 пассажей). Колонии МСК, перициты и фибробласты обнаружены в 8% оттаянного костного мозга. Перициты и фибробласты, прикрепившиеся ко дну чашки, росли и покрывали всю ее поверхность, а также участвовали в построении необычных «конфлюентных» структур на поверхности культуры. Некоторые из этих структур обладали свойством автосокаращения. ГСК успешно культивировали поверх конфлюентного слоя фибробластов. Не наблюдалось бактериального заражения в результирующей культуре. Хранение стволовых клеток, а также клеток пуповинной крови при -60 до -80°C в механическом холодильнике или в парах жидкого азота не позволило после отогрева получить колонии, вероятно, из-за нестабильного температурного режима, вызванного открыванием двери, приводящего к фатальной рекристаллизации в клеточных суспензиях.

This study was performed to confirm viability and differentiation in culture of the thawed bone marrow cells, umbilical cord cells, and peripheral lymphocytes which had been cryopreserved for 30–40 years since 1972.

Autologous bone marrow cells of $5.1 \pm 2.9 \times 10^{6-9}$ were harvested for salvage of 293 advanced solid cancer patients before chemo-ablation, suspended in a 15% (final concentration) glycerol in a tissue culture medium 199 in 1972–1980, or in a 10% (final concentration) Me_2SO in the autologous plasma solution, enclosed in a Teflon-Capton bag, cooled down to around $-75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ at a controlled rate of 2–5 deg/min using programmed cooling device, and preserved in a liquid phase of liquid nitrogen for 30 to 40 years at -196°C since 1972. Containers with bone marrow cells which were not used to treat patients had been continuously preserved in liquid nitrogen stocker until today. In 2010 we decided to thaw those cells in order to study the viability and differentiation of hematopoietic (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs). Thawed cells were cultured in Petri dish with culture media and appropriate growth factors: adult human sera and/or limulus (horseshoe crab) blood cell lysate in special incubator maintaining the correct conditions of 37°C and 5% CO_2 . The culture medium was replenished at regular time intervals, two to three times per week.

The studies showed that: monocytes- and erythroblast-CFU appeared in 96% of thawed bone marrow. Recovery (%) of HSCs of thawed marrows gave the regression equation: $Y = -0.0003X + 0.0367$ on March 15, 2012, which suggests that freezing in liquid nitrogen hardly influences the CFU-C recovery (%) of marrow stem cells. The increased expression of surface markers: CD2, 4, 11b, 13, 16, 33, 38, HLA-DR, and GP-A clarified that the right growth factors in the media effectively stimulated the proliferation and differentiation of those cells to express surface makers. Some colony cells of Day 5–7 continuously survived to form colonies for up to minimum 3 months as the 4th–6th passages. Colonies of MSCs, pericytes and fibroblasts appeared in 8% of thawed bone marrows. Pericytes and fibroblasts attached to the bottom of dish to grow up and covered the entire surface of the dish, and recruited to construct interesting 'confluent' frameworks on the surface in culture. Some of these structures showed automatically contraction, suggesting MSCs differentiation into cardiomyocytes or other cell types. HSCs were successfully cultured on top of a confluent layer of fibroblasts. Although 6 of 90 containers ruptured during thawing, but there were neither bacterial contamination nor obstacles in the culture results afterward. The cryopreservation of stem cells and also cord blood cells at -60 to -80°C in the mechanical freezer and in the vapour phase of liquid nitrogen did not constantly succeed in the formation of colonies, probably due to long-termed duration of unstable temperatures caused by the repetitive opening and shutting of the door, resulting in fatal recrystallization of the cells.