

Криоконсервирование кордовой крови: оценка структурно-функционального состояния ядродержащих клеток

Л.А. БАБИЧУК, П.М. ЗУБОВ, В.В. РЯЗАНЦЕВ, О.Л. ЗУБОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Cord Blood: Evaluation of Structure-Functional State of Nucleated Cells

L.A. BABYCHUK, P.M. ZUBOV, V.V. RYAZANTSEV, O.L. ZUBOVA

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

Разработка новых технологий криоконсервирования и создания банков, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии при температуре жидкого азота, обусловлена высокой востребованностью в препаратах кордовой крови (КК), содержащих гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Эффективность применения препаратов КК в клинике определяется не только достаточным количеством клеток, но и их качеством, т. е. сохранением структурно-функциональной полноценности клеток после размораживания. Цель данной работы – разработка новых технологий криоконсервирования ядродержащих клеток КК и комплексная оценка структурно-функциональной полноценности клеток на каждом этапе криоконсервирования.

Определение фенотипа клеток, их жизнеспособности ($CD45^+7AAD^-$, $CD34^+7AAD^-$), а также нарушения асимметрии мембран проводились с использованием метода проточной цитофлуориметрии. Колониеобразующую активность оценивали в метилцеллюлозной среде «MethoCult» («StemCellTechnologies»).

Анализ сохранности ЯСК, выделенных с применением декстрана Д-60, показал, что данный метод позволяет выделять до 80% $CD45^+$ - и до 90% $CD34^+$ - клеток из КК и не приводит к снижению их жизнеспособности. Разработанный метод криоконсервирования ЯСК КК позволяет снизить концентрацию ДМСО до 5% и получить после размораживания высокий процент жизнеспособных клеток (до 85% $CD45^+7AAD^-$ - и до 95% $CD34^+7AAD^-$ -клеток). При этом снижение сохранности и жизнеспособности $CD45^+$ -клеток происходит в основном за счет гранулоцитов, жизнеспособность которых составляет $69,8 \pm 3,7\%$, а мононуклеаров (лимфоциты и моноциты) – 94–98%.

Оценка нарушений липидной асимметрии мембран с использованием аннексина V свидетельствует, что выделение и обработка ДМСО достоверно не изменяют данный показатель, а после размораживания клеток нарушение асимметрии составляет $6,34 \pm 1,02\%$. Анализ липидной асимметрии в популяциях ЯСК показал, что после криоконсервирования минимальные изменения наблюдаются у мононуклеаров (до 3%), максимальные – у гранулоцитов (16%), что коррелирует с полученными нами данными по жизнеспособности клеток.

Проведенные исследования колониеобразующей активности показали, что клетки образовывали колонии, имеющие эритроидную, гранулоцитарную, макрофагальную и смешанную морфологию, что характерно для стволовых клеток гемопоэтического ряда. Общее количество колоний до и после криоконсервирования изменялось незначительно и составляло $228,6 \pm 31,4$ и $247,6 \pm 36,8$ соответственно.

The development of new cryopreservation technologies and establishment of banks wherein the samples are stored in frozen state at the temperature of liquid nitrogen is stipulated by a high demand in cord blood (CB) preparations containing hematopoietic stem cells (HSCs). Efficiency of CB preparations use in clinics is determined by a sufficient number of cells as well as their quality, *i. e.* preservation of their structure-functional viability after thawing. The research aim was to develop new cryopreservation technologies for CB nucleated cells and complex evaluation of cell structure-functional integrity at each cryopreservation stage.

Determination of cell phenotype, their viability ($CD45^+7AAD^-$, $CD34^+7AAD^-$) and disorders of membrane asymmetry were performed by flow cytofluorimetry. Colony-forming activity was assessed in methyl cellulose medium MethoCult (StemCellTechnologies).

Analysis of survival of nucleated cells isolated with dextran D-60 showed that this method allowed isolating up to 80% of $CD45^+$ and up to 90% of $CD34^+$ cells from CB and not inducing the decrease of their viability. The developed method of CB NCs cryopreservation enables decreasing DMSO concentration down to 5% and obtaining after thawing a high percent of viable cells (up to 85% of $CD45^+7AAD^-$ and up to 95% of $CD34^+7AAD^-$ cells). Moreover decrease of survival and integrity of $CD45^+$ cells occurs mainly due to granulocytes, the viability of which is $69.8 \pm 3.7\%$ and one of mononuclears (lymphocytes and monocytes) makes 94–98%.

Evaluation of disorders in membrane lipid asymmetry using AnnexinV showed that the process of cell isolation and treatment with DMSO do not significantly change this index and after thawing the amount of cells with distorted asymmetry is $6.34 \pm 1.02\%$. Analysis of lipid asymmetry in NCs populations has shown that after cryopreservation minimal changes were observed in mononuclears (up to 3% of cells), maximal ones were in granulocytes (16%) correlating with obtained data for cell viability.

The performed investigations of colony-forming activity have shown that the cells formed colonies with erythroid, granulocytic, macrophagal and mixed morphology characteristic for stem cells of hematopoietic range. Total number of colonies prior to and after cryopreservation changed insignificantly and made 228.6 ± 31.4 and 247.6 ± 36.8 , respectively.