

УДК 611.018.5.013.8:615.014.41:547.42

Л.А. БАБИЙЧУК, П.М. ЗУБОВ*, В.В. РЯЗАНЦЕВ, О.Л. ЗУБОВА

**Безотмывочный метод криоконсервирования кордовой крови:
оценка популяционного состава ядродержащих клеток**

UDC 611.018.5.013.8:615.014.41:547.42

L.A. BABIYCHUK, P.M. ZUBOV*, V.V. RYAZANTSEV, O.L. ZUBOVA

**Cord Blood Preservation Method with No Washing-Out:
Estimation of Populations of Nucleated Cells**

Разработаны новые эффективные методы выделения и криоконсервирования ядродержащих клеток из кордовой крови, которые позволяют практически полностью сохранять количественный и качественный состав клеток КК (в том числе и гемопоэтических) после выделения и обеспечивают достаточно высокую сохранность после криоконсервирования. Анализ популяционного состава CD45⁺-клеток свидетельствует, что CD34⁺-клетки, а также лимфоциты и моноциты демонстрируют высокий уровень сохранности и жизнеспособности после размораживания.

Ключевые слова: ядродержащие клетки, криоконсервирование, ПЕО-1500, популяции, кордовая кровь.

Розроблено нові ефективні методи виділення та криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, які дозволяють практично повністю зберегти кількісний та якісний склад клітин КК (у тому числі і гемопоетичних) після виділення та забезпечують досить високу збереженість після криоконсервування. Аналіз популяційного складу CD45⁺-клітин свідчить, що CD34⁺-клітини, а також лімфоцити та моноцити демонструють високий рівень збереженості та життєздатності після розморожування.

Ключові слова: ядровмісні клітини, криоконсервування, ПЕО-1500, популяції, кордова кров.

There were elaborated new effective methods for isolation and cryopreservation of cord blood nucleated cells, which allow to preserve quite whole quantitative and qualitative contents of nucleated cells (including hemopoietic cells) after isolation and demonstrate quite a high recovery after freeze-thawing. The analysis of CD45⁺-cell population content testified that CD34⁺-cells as well as lymphocytes and monocytes manifested a high level of recovery and viability after freezing.

Key-words: nucleated cells, cryopreservation, PEO-1500, populations, cord blood.

В настоящее время значительно возрос интерес к кордовой крови (КК) как к альтернативному источнику репопулирующих гемопоэтических стволовых клеток, пригодному для трансплантации. Вследствие особенностей клеточного состава КК и полученные из нее препараты находят все большее применение в клинической практике для лечения целого ряда заболеваний, в первую очередь гематологических [1].

Однако, учитывая небольшие объемы КК (в среднем не более 100 мл), очень важным является как заготовка максимального количества крови, так и полное выделение ядродержащих клеток (ЯСК), в том числе и гемопоэтических, при сепарации. Все это обуславливает необходимость разработки эффективных методов получения, криоконсервирования и хранения клеток КК.

В мировой практике наибольшее распространение получил метод выделения ЯСК в градиенте плотности фиколла или перколла. Сепарация в градиенте плотности позволяет получить преимущественно мононуклеарные клетки, но приводит к значительным потерям гемопоэтических предшественников (от 30 до 50%) [4].

Для криоконсервирования ядродержащих клеток КК широко используется метод с применением криопротектора ДМСО [6]. Однако ДМСО, хорошо проникающий в клетки, обуславливает необходимость его удаления после размораживания, что существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и приводит к потере части клеток в процессе отмывания. Поэтому наиболее перспективна для криоконсервирования ядродержащих клеток КК

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38
(057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23,
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373
3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

разработка безотмывочных методов замораживания-отогрева с использованием непроникающих в клетку криопротекторов.

Цель работы – разработка методов наиболее полного выделения ЯСК из кордовой крови и эффективного метода их криоконсервирования, а также оценка сохранности и жизнеспособности популяционного состава ЯСК кордовой крови до и после криоконсервирования.

Материалы и методы

В работе использовали КК человека, заготовленную на общепринятом глюкозо-цитратном растворе. Кордовую кровь замораживали в день взятия или после ее хранения при постоянной температуре 4–2°C в течение 48 ч. Объем КК меньше 60 мл в работе не использовали.

Фракцию ЯСК из КК выделяли с помощью оригинального, двухэтапного центрифугирования цельной крови при 200g в течение 20 мин с последующим фракционированием и отделением слоя ЯСК [2]. В части экспериментов ЯСК выделяли стандартным фикольным методом. В качестве криопротектора использовали 30%-й ПЭО-1500, приготовленный на физиологическом растворе. Криопротектор добавляли к суспензии клеток по методу “холодовой” обработки 1:1 по объему [3]. Контролем сравнения служили пробы, обработанные при комнатной температуре. Клетки замора-

живали до –196°C по специально разработанной нами двухэтапной программе, отогревали при 42–44°C в водяной термостатируемой бане при постоянном покачивании.

Исследования ЯСК (CD45⁺) кордовой крови, в том числе и гемопоэтических (CD34⁺) до и после криоконсервирования, были проведены методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (США) с использованием реагентов Becton Dickinson по общепринятому международному ISHAGE протоколу.

Результаты и обсуждение

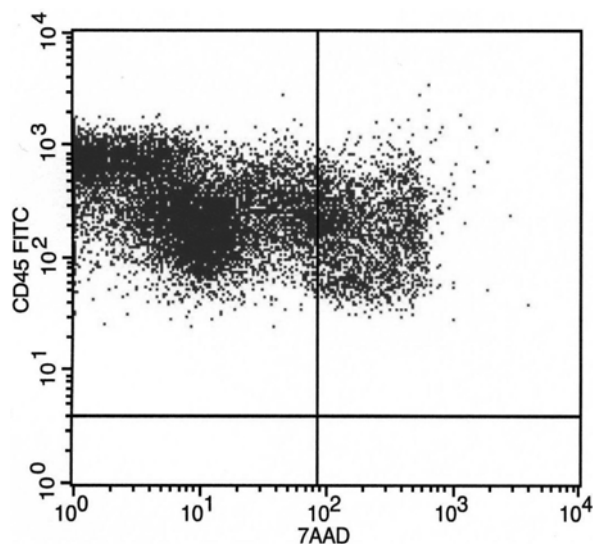
Для разделения КК на плазму, ЯСК и эритроциты был применен метод двухэтапного центрифугирования [2] с последующим разделением на эритроциты и концентрат ЯСК в аутоплазме, которые затем обрабатывали криопротектором и замораживали.

Особую роль в последующем криоконсервировании и хранении играет оценка качества получаемых ЯСК, для чего было определено содержание ядродержащих (CD45⁺) и гемопоэтических (CD34⁺) клеток, а также их жизнеспособность на проточном цитофлуориметре. Для сравнения была проведена оценка качества клеток, выделенных с помощью общепринятого в мировой практике метода с использованием фиколл-верографина.

Нами показано, что предложенный метод сепарации клеток позволяет выделять до 95% CD45⁺-клеток и до 97% CD34⁺-клеток. Важно отметить, что фиколл вызывает потери выделяемых клеток (от 35 до 55%), поэтому его использование не является однозначно положительным. Также падает качество получаемого концентрата ЯСК, так как снижается абсолютный показатель CD34⁺-клеток (от $3,4 \pm 1,1 \times 10^6$ в цельной крови до $2,0 \pm 1,3 \times 10^6$ в концентрате после выделения фиколлом). Метод центрифугирования для получения концентрата ЯСК, обогащенного стволовыми клетками, позволяет практически полностью сохранить (до $3,2 \pm 1,2 \times 10^6$) изначальное количество CD34⁺-клеток, присутствующих в цельной крови.

Важно отметить, что уже на этапе выделения фиколлом снижается жизнеспособность ЯСК на 5–10% и до 15% стволовых гемопоэтических клеток. Это может указывать на явный дестабилизирующий эффект данного вещества на клетки. При выделении ЯСК разработанным нами методом снижение жизнеспособности клеток не наблюдалось.

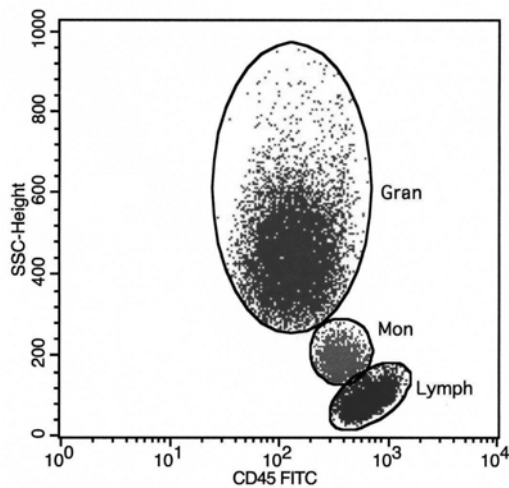
В дальнейших исследованиях для криоконсервирования концентрата ЯСК кордовой крови был применен метод “холодовой” обработки ПЭО-1500 [3] и специальный режим двухэтапного замораживания до –196°C. Данный метод позволяет



Quadrant statistica
X Parameter: 7AAD (Log)
Y Parameter: CD45 FITC (Log)

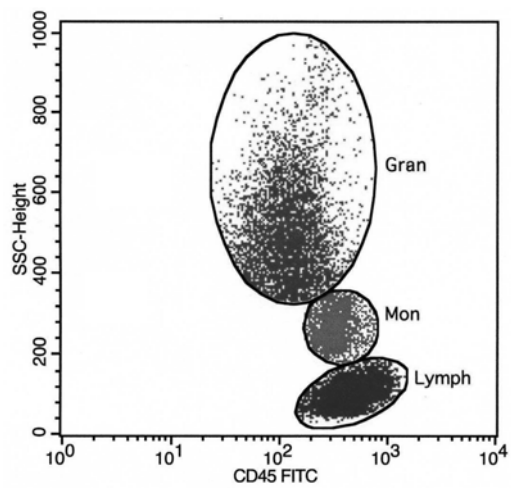
Quad	%	Gated
Region		% Gated
UL	83.93	
UR	16.07	
LL	0.00	
LR	0.00	

Рис. 1. Жизнеспособность CD45⁺-клеток после криоконсервирования.



Region statistica	
Gate % Gated	
Lymph	32.54
Mon	9.56
Gran	58.07

а



Region statistica	
Gate % Gated	
Lymph	48.10
Mon	15.61
Gran	36.31

б

Рис. 2. Популяционный состав ЯСК кордовой крови до (а) и после (б) криоконсервирования.

сохранять после размораживания до 75% CD45⁺-клеток и до 83% CD34⁺-клеток. При этом жизнеспособность CD45⁺-клеток составляла до 85, а CD34⁺-клеток до 90% (рис.1).

Анализ популяционного состава лейкоцитов показал, что как процесс инкубации клеток с криопротектором ПЭО-1500, так и процесс криоконсервирования вызывает перераспределение в процентном содержании лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов в сторону увеличения удельного содержания фракции мононуклеаров за счет снижения количества гранулоцитов (рис.2).

Пересчет в абсолютные значения показал, что разработанный метод криоконсервирования позволяет сохранять 95±3,3% лимфоцитов, 85±4,9% моноцитов и 48±3,9% гранулоцитов от первоначального их содержания в цельной КК.

Определение сохранности является очень важным, но недостаточным тестом для оценки структурно-функциональной полноценности клеток. В связи с этим была определена жизнеспособность как популяций лейкоцитов, так и гемопоэтических стволовых клеток по ДНК красителю 7AAD.

Проведенный анализ показал, что жизнеспособность CD34⁺-клеток составляла после размораживания до 90%. Жизнеспособность популяций ЯСК была максимальна у лимфоцитов (95±2,8%) и минимальна у гранулоцитов (87±5,9%). Жизнеспособность моноцитов составляла 93±4,7%.

Следует отметить, что после выделения мононуклеаров фиколлом процентное соотношение CD45⁺-клеток в среднем составляло: лимфоцитов – 66±8,8%, моноцитов – 24±2,2%, гранулоцитов – 4,5±0,9%. На стадиях обработки криопротек-

тором и после замораживания-отогрева данное соотношение достоверно не изменялось. Жизнеспособность клеток была значительно ниже, чем при разработанном нами методе (лимфоциты – 78±6,2%, моноциты – 75±5,9%). Жизнеспособность CD34⁺-клеток составляла порядка 54%.

Выводы

1. Предложенный метод выделения ЯСК из кордовой крови позволяет практически полностью сохранять их количественный и качественный состав.

2. Разработанный безотмывочный метод криоконсервирования ЯСК с непроникающим криопротектором ПЭО-1500 обеспечивает высокую сохранность и жизнеспособность после криоконсервирования популяций лимфоцитов, моноцитов, а также CD34⁺-клеток.

Литература

1. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови // Вопросы онкологии. – 2000. – Т. 46, №5. – С. 156–164.
2. Пат. України № 23499 МПКС12N5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові / Л.О. Бабійчук, В.В. Рязанцев, О.Л. Зубова, В.І. Грищенко; Заявл. 22.01.2007; Опубл. 25.05.2007. Бюл.№7.
3. Пат. України №30888А МПК6A01N1/02. Спосіб консервування еритроцитів/ Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, С. Суміда, В.А. Бондаренко, Н.Г. Землянських, Т.П. Бондаренко. Заявл. 16.06.98; Опубл. 15.12.2000. – Бюл. №7.
4. Cornetta K., Laughlin M., Carter S. et al. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective cord blood transplantation (COBLT) // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2005. – Vol. 11, N2. – P. 149–160.

5. *Denning-Kendall P., Donaldson C., Nicol A. et al.* Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking // *Exp. Hematol.*– 1996.– Vol. 24, N 12.– P. 1394–1401.
6. *Laroche V., McKenna D., Moroff G. et al.* Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples // *Transfusion.*– 2005.– Vol. 45, N12.– P. 1909–1916.

Поступила 10.07.2008