

Новые методы криоконсервирования кордовой крови человека под защитой непроникающего криопротектора полиэтиленоксида м.м. 1500

Л.А. БАБИЙЧУК, В.В. РЯЗАНЦЕВ, П.М. ЗУБОВ, О.Л. ТИМЧЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В последнее время кордовая кровь (КК) и полученные из нее препараты находят все большее применение в клинической практике. Все чаще кордовая кровь используется как альтернативный костному мозгу источник гемопоэтических стволовых клеток [9]. Причем в клинических целях используется как концентрат ядродержащих клеток, так и цельная кордовая кровь, в которой содержится большое количество эритроцитов, ядродержащих клеток, а также биологически активных веществ плазмы кордовой крови.

В связи с этим возникает необходимость создания банков кордовой крови и полученных из нее клеточных препаратов. Решение этой задачи возможно только при долгосрочном хранении клеток в замороженном состоянии. Поэтому разработка методов криоконсервирования кордовой крови является актуальной проблемой криобиологии.

В настоящее время наиболее широко используемым методом для криоконсервирования ядродержащих клеток КК является метод с применением криопротектора ДМСО [8]. Однако ДМСО, хорошо проникающий в клетки, обуславливает необходимость его удаления после размораживания. Это существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и приводит к потере части клеток в процессе отмывания.

Проблема криоконсервирования цельной КК является более сложной. Это связано с тем, что во-первых, для эритроцитов и ядродержащих клеток, входящих в состав цельной КК, эффективными для криоконсервирования являются как различные типы криопротекторов, так и различные режимы замораживания [4]; во-вторых, при криоконсервировании цельной КК использование проникающих криопротекторов делает невозможным сохранить в одном препарате ядродержащие клетки КК и эритроциты, так как при отмывании криопротектора из размороженной суспензии клеток остаются только эритроциты, а теряются плазма и ядродержащие клетки.

Поэтому наиболее перспективным для криоконсервирования ядродержащих клеток КК и

Адрес для корреспонденции: Бабийчук Л.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

особенно цельной КК является разработка безотмывочных методов криоконсервирования с использованием непроникающих в клетку криопротекторов.

В наших предыдущих работах было показано, что среди различных непроникающих криопротекторов наиболее эффективным для криозащиты эритроцитов донорской крови человека является полиэтиленоксид с м.м. 1500 (ПЭО-1500) [4]. Однако, при работе с данным криопротектором, также как и с другими непроникающими криопротекторами необходимо соблюдать определенные условия для избежания осмотического и температурного шока клеток.

В связи с этим нами были проведены исследования механизмов температурно-осмотической стабилизации клеток к действию криопротекторов и низких температур. На модели эритроцитов установлено, что важная роль в механизмах стабилизации клеток к действию факторов криоконсервирования принадлежит белкам цитоскелета клеток [6]. Показано, что направленность структурной модификации плазматических мембран и белков цитоскелета клеток определяется влиянием температуры и уровнем дегидратации на системы, регулирующие их структурно-функциональное состояние. Это связано с изменением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и уровнем фосфорилирования белков [1].

На основании этих фундаментальных исследований обоснованы новые подходы для направленной модификации структурно-функционального состояния клеток на начальных этапах перед криоконсервированием с целью повышения их устойчивости к замораживанию-отогреву. Разработаны оптимальные условия для структурной стабилизации эритроцитов, заключающиеся в предварительной холодной инкубации клеток и дозированном введении криопротектора. На основании принципа "холодовой" стабилизации разработан безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов под защитой непроникающего криопротектора ПЭО-1500 [3], который позволяет в значительной степени повысить устойчивость клеток к замораживанию-отогреву и сохранять их структурно-функциональные показатели на достаточно высоком уровне [2].

Цель исследования – разработка безотмы-
вочных методов криоконсервирования суспензии
ядросодержащих клеток кордовой крови и цельной
кордовой крови для сохранения в ней клеток
различного типа (эритроцитов, ядросодержащих
клеток).

Материалы и методы

В работе использовалась КК человека, получен-
ная из вены пульсирующей пуповины, заготов-
ленная на общепринятом глюкозо-цитратном
растворе. КК замораживали в день взятия крови
или после ее хранения при постоянной температуре
2-4°C в течение 48 часов. Объем кордовой крови
меньше 60 мл в работе не использовался.

Выделение фракции ядросодержащие клетки из
кордовой крови проводили с помощью центри-
фугирования цельной крови при 200 g в течение 20
минут с последующим фракционированием и
отделением слоя ядросодержащих клеток. В части
экспериментов ядросодержащие клетки выделя-
лись стандартным фиколиновым методом. В
качестве криопротектора использовали 30%
раствор ПЭО-1500, приготовленный на физио-
логическом растворе NaCl и 0,01 M фосфатном
буфере. Добавление криопротектора к суспензии
клеток проводили дозировано при низкой положи-
тельной температуре 1:1 по объему. Контролем
сравнения служили пробы, обработанные крио-
протектором при комнатной температуре. Затем
взвесь клеток переносили в специальные крио-
пробирки фирмы Nunc для замораживания.

Замораживание проводили до -196°C по
специально разработанной нами индивидуальной
для каждого объекта (цельная КК и ядросодер-
жащие клетки) двухэтапной программе. Оттаива-
ние производили при 42-44°C в водяной термо-
стабируемой бане при постоянном покачивании.
После размораживания цельной КК определяли
уровень гемолиза клеток и основные структурно-

функциональные показатели эритроцитов – АТФ
[7] и 2,3-ДФГ [5].

Биологически активные вещества плазмы КК
измеряли с использованием лабораторных тест-
систем методом иммуноферментного анализа.
Исследование ядросодержащих клеток (CD45⁺)
КК, в том числе и гемопоэтических (CD34⁺) до и
после криоконсервирования были проведены
методом проточной цитофлуориметрии на проточ-
ном цитометре FACS Calibur фирмы Becton
Dickinson (США) с использованием реагентов
Becton Dickinson по международному ISHAGE
протоколу.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что
разработанный метод криоконсервирования
цельной КК с непроникающим криопротектором
ПЭО-1500 с использованием “холодовой” обра-
ботки клеток и специальной двухэтапной програм-
мы замораживания позволяет сохранять до 96%
эритроцитов после размораживания, при этом
основные функциональные показатели клеток (АТФ
и 2,3-ДФГ) сохраняются на уровне контрольных
величин (рис. 1). Биологически активные вещества
плазмы КК (трийодтиронин, тироксин, тирео-
тропный гормон, тестостерон и α-фетопротеин)
полностью сохраняются после криоконсерви-
рования (таблица).

Исследование ядросодержащих клеток
(CD45⁺) КК, в том числе и гемопоэтических
(CD34⁺/CD45⁺), до и после размораживания
показало, что разработанный метод криокон-
сервирования цельной КК позволяет сохранять
после размораживания до 80% CD45⁺-клеток по
отношению к контролю. Сохранность же CD34⁺-
клеток еще более высокая и составляет 86% от
контроля (рис. 2), что может свидетельствовать о
большей криоустойчивости популяции CD34⁺-
клеток по отношению к CD45⁺-клеткам. При этом

Содержание биологически активных веществ в плазме после криоконсервирования цельной кордовой крови

Экспериментальные условия	Содержание веществ				
	Тестостерон, нМ/л	Трийодтиронин, нМ/л	Тироксин, нМ/л	Тиреотропный гормон, МЕ/л	α – фетопротеин, мг/л
Контроль (донорская плазма)	0,5 – 2,2	1,2 – 2,8	60 – 160	0,5 – 4,0	20
Нативная кордовая плазма	5,0	1,1	65	4,7	3300
Кордовая плазма после криоконсервирования при -196°C	4,8	1,1	61	4,6	2950

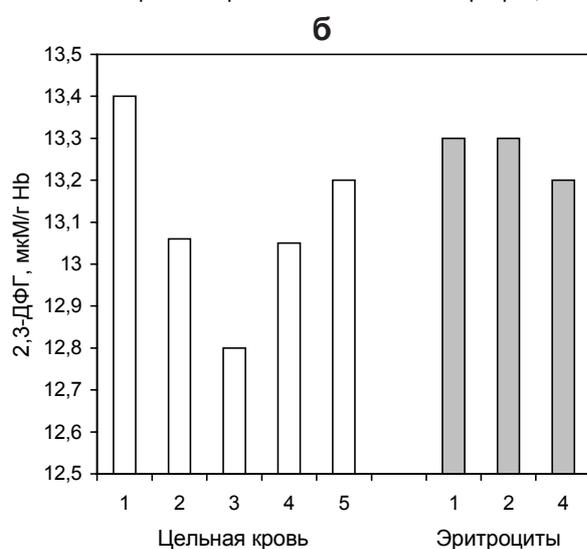
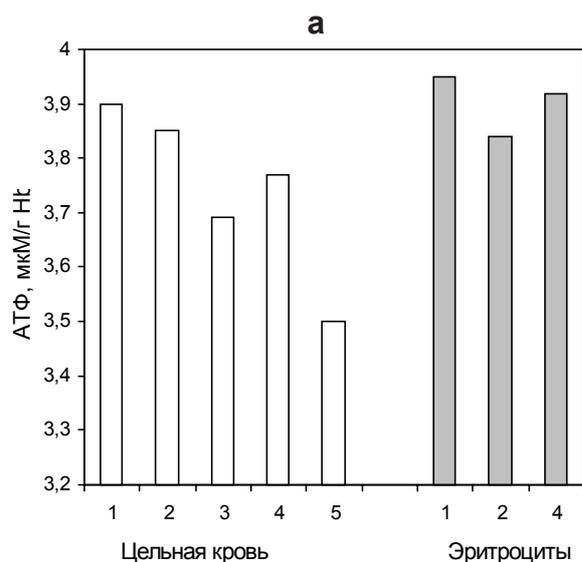


Рис. 1. Содержание АТФ (а) и 2,3-ДФГ (б) в изолированных эритроцитах и в составе цельной кордовой крови после криоконсервирования С ПЭО-1500: 1 – контроль, нативные клетки; 2 – холодовая дозированная обработка клеток криопротектором ПЭО-1500; 3 – обработка клеток ПЭО-1500 при комнатной температуре; 4 – холодовая дозированная обработка клеток ПЭО-1500 и замораживание по двухэтапной программе; 5 – обработка клеток ПЭО-1500 при комнатной температуре и замораживание по двухэтапной программе.

использование процедуры “холодовой” обработки клеток цельной КК ПЭО-1500 обеспечивает максимальные уровни сохранности после размораживания как эритроцитов, так и ядросодержащих клеток по сравнению со способом обработки ПЭО-1500 при комнатной температуре (рис.2, группы 4 и 5). Для сравнения также был использован общепринятый метод криоконсервирования донорской крови погружением в жидкий азот при -196°C , который показал более низкие показатели сохранности CD45^{+} и $\text{CD34}^{+}/\text{CD45}^{+}$ клеток цельной КК (рис.2, группы 6 и 7).

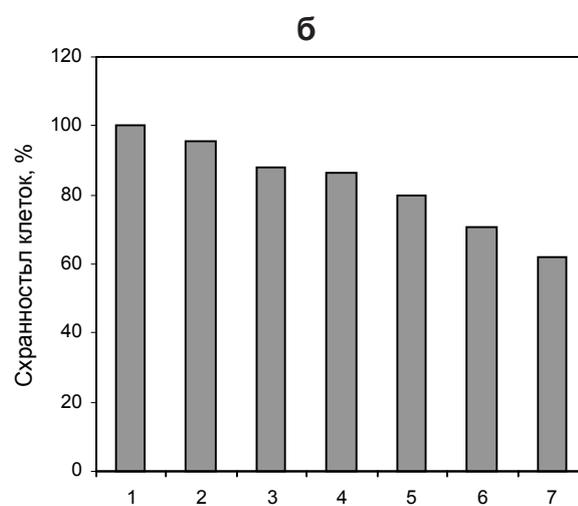
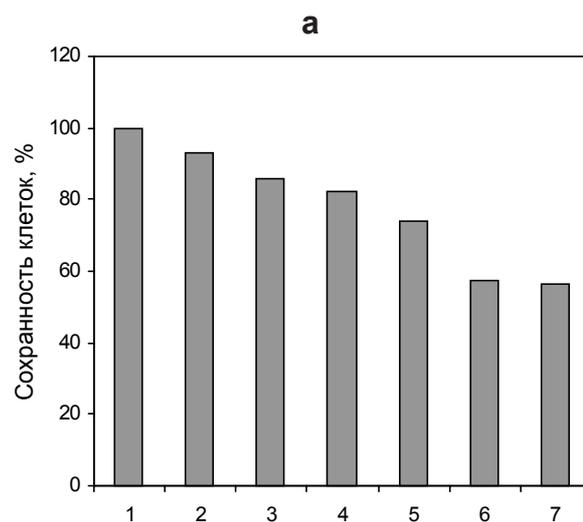


Рис. 2. Сохранность ядросодержащих клеток (CD45^{+}) (а) и CD34^{+} -клеток (б) при криоконсервировании цельной кордовой крови в зависимости от способа обработки и режима замораживания (данные представлены в % от контроля): 1-5 как на рис. 1; 6 – холодовая дозированная обработка клеток ПЭО-1500 и замораживание погружением в жидкий азот; 7 – обработка клеток ПЭО-1500 при комнатной температуре и замораживание погружением в жидкий азот.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что разработанный безотмывочный метод криоконсервирования цельной кордовой крови обеспечивает высокую сохранность одновременно в препарате двух типов клеток (эритроциты, ядросодержащие клетки, в том числе и гемопоэтические CD34^{+} -клетки) и биологически активных веществ плазмы кордовой крови.

Нами был также разработан безотмывочный метод криоконсервирования концентрата ядросодержащих клеток, выделенных из КК человека. Метод концентрирования ядросодержащих клеток

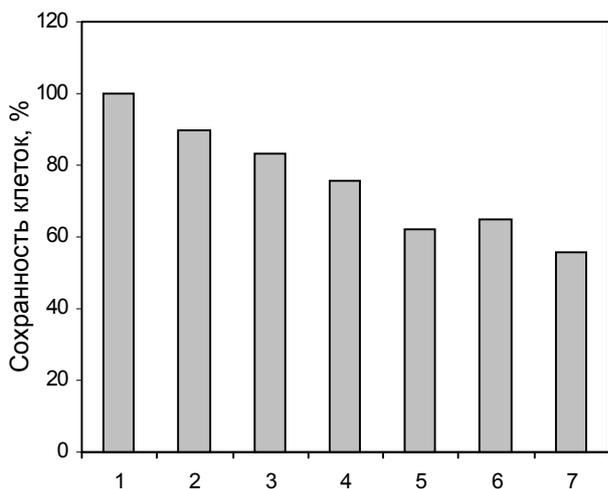


Рис. 3. Сохранность CD45⁺-клеток при криоконсервировании концентрата ядродержащих клеток в зависимости от способа обработки клеток криопротектором ПЭО-1500 и режима замораживания (данные представлены в % от контроля): обозначения групп см. рис. 1 и 2.

КК позволил добиться более высокого удельного содержания ЯСК и особенно CD34⁺-клеток по сравнению с цельной КК и даже с традиционным методом выделения мононуклеаров с помощью Ficoll, в частности, по нашему способу концентрирование достигается в среднем в 3,5 раза по сравнению с первоначальным содержанием CD34⁺-клеток в цельной КК. В дальнейших исследованиях для криоконсервирования концентрата ядродержащих клеток КК также был применен метод холодной обработки клеток ПЭО-1500 и создан специальный режим двухэтапного замораживания до -196°C.

Данный метод позволяет сохранять после размораживания до 75% CD45⁺-клеток (рис. 3) и до 83% CD34⁺-клеток (рис. 4, а). Важно отметить, что такая сохранность CD34⁺-клеток значительно выше их удельного содержания в концентрате клеток, полученного с помощью Ficoll и замороженного с ПЭО-1500 в таких же условиях (рис. 4, б), что свидетельствует о более высоком качестве концентрата ядродержащих клеток, полученного и криоконсервированного нашим методом, хотя у нас отмечается некоторая примесь эритроцитов.

Еще одним положительным результатом использования метода криоконсервирования с ПЭО-1500 является отмеченная более высокая сохранность после криоконсервирования гемопоэтических клеток CD34⁺ по отношению к ядродержащим клеткам CD45⁺, что позволяет говорить о большей криоустойчивости популяций гемопоэтических стволовых клеток в данных условиях.

Выводы

1. Разработан безотмывочный метод криоконсервирования цельной кордовой крови, основанный

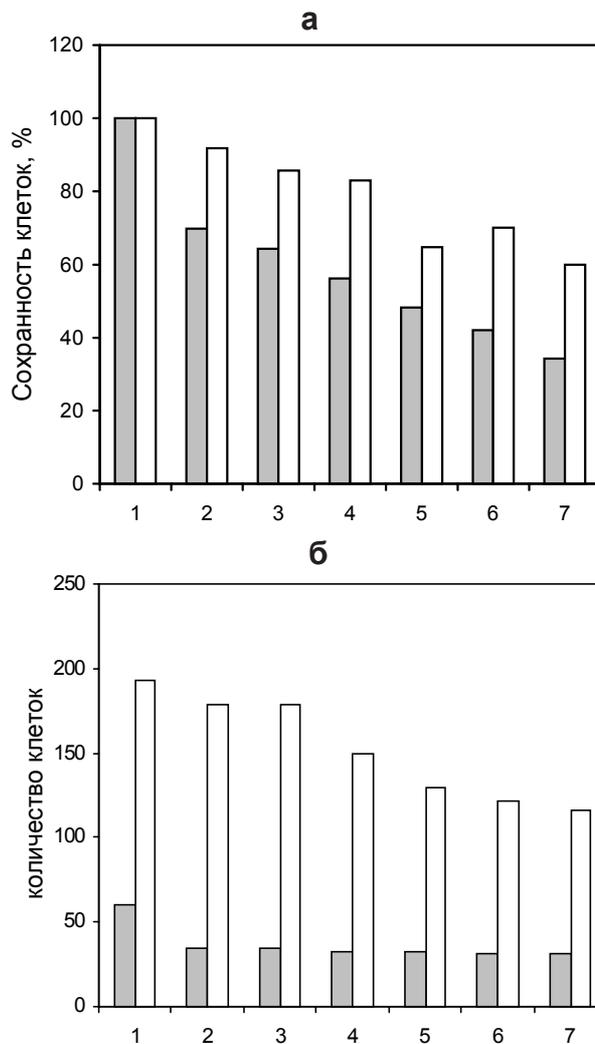


Рис. 4. Сохранность CD34⁺-клеток при криоконсервировании концентрата ядродержащих клеток в зависимости от способа обработки и режима замораживания (а – данные представлены в % от контроля, б – количество клеток в мкл суспензии): ■ – фиколл; □ – концентрат; обозначения групп см. рис. 1 и 2.

на применении непроницающего криопротектора ПЭО-1500 в сочетании с “холодовой” обработкой клеток перед замораживанием и специальной двухэтапной программой замораживания, который обеспечивает высокую сохранность одновременно в препарате двух типов клеток (эритроциты, ядродержащие клетки, в том числе гемопоэтические) и биологически активных веществ плазмы кордовой крови.

2. Разработан безотмывочный метод криоконсервирования концентрата ядродержащих клеток с использованием криопротектора ПЭО-1500, “холодовой” обработки клеток и специально разработанной для ядродержащих клеток по двухэтапной программе.

3. При криоконсервировании как цельной КК, так и концентрата ядродержащих клеток, разработанными безотмывочными методами,

обнаружена более высокая сохранность гемопоэтических клеток (CD34⁺) по отношению к CD45⁺-клеткам, что свидетельствует о большей криоустойчивости популяции гемопоэтических стволовых клеток.

Литература

1. *Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г., Белоус А.М.* Влияние полиэтиленоксида и сахарозы на содержание Ca²⁺ и фосфорилирование белков спектрин-актинового комплекса эритроцитов при охлаждении и замораживании-отогреве // Проблемы криобиологии.– 1995.– №2.– С. 9-14.
2. *Бабийчук Л.О., Землянських Н.Г., Кузьміна Л.М.* Новий метод кріоконсервування еритроцитів для клінічної практики // Трансплантологія.– 2000.– Т.1, №1.– С. 296-298.
3. *Пат. України № 30888 А* Спосіб кріоконсервування еритроцитів / Л.О. Бабийчук, В.І. Грищенко, С. Сумида та ін. Заявл. 16.06.98. Опубл. 15.12.2000.– Бюл. № 7.– С. 1.20.
4. *Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.* Криопротекторы.– Киев: Наукова думка, 1978.– 204 с.
5. *Шарова Ю.А., Бирюкова Т.В., Шаноян С.А.* Неферментативный метод определения 2,3-дифосфоглицериновой кислоты эритроцитов и возможности его использования в клинической практике // Лаб. дело.– 1978.– №7.– С. 413-415.
6. *Babiychuk L.A., Zemlyanskikh N.G., Belous A.M.* The role of cytoskeletal proteins in cell stability // Cell Biol. Int.– 1997.– Vol.21, N12.– P. 847-849.
7. *Beutler E.* Red cell metabolism: A manual of biochemical methods.– New York, 1975.– 160 p.
8. *U.S. Patent 5.004.681.* Preservation of fetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood / Boyse E.A., Broxmeyer H.E., Douglas G.W (1991)
9. *Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1989.– Vol. 86.– P. 3828-3832.