

© О.А. Михайлова, Л.А. Бабийчук, В.В. Рязанцев, П.М. Зубов

УДК 611-018.5.013.8:615.014.41

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

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И СТЕПЕНИ НАРУШЕНИЯ АСИММЕТРИИ МЕМБРАН ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ ЦЕЛЬНОЙ КОРДОВОЙ И ДОНОРСКОЙ КРОВИ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Работа выполнялась в соответствии с научной темой: «Изучение механизмов структурно-функциональных изменений ядродержащих клеток кордовой крови и эритроцитов под влиянием экзо- и эндоцеллюлярных криопротекторов и низких температур», государственный регистрационный номер темы 0109U00278.

Вступление. В течение последних десятилетий для лечения различных форм лейкозов, апластических анемий и ряда других тяжелых заболеваний системы крови все чаще используют гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) [15]. Традиционно выделяют три основных источника данных клеток: костный мозг (КМ), кордовая кровь (КК) и мобилизованная донорская кровь (ДК).

Многие годы КМ был единственным источником гемопоэтических клеток и только он традиционно использовался для аллогенной трансплантации гемопоэтической ткани. Несмотря на большее содержание ГСК в КМ, по сравнению с другими источниками, осуществление пересадок костного мозга связано со значительными трудностями в заборе материала и подборе подходящего донора. К концу 90-х годов для аллогенной трансплантации при различных заболеваниях все чаще стали применять ГСК из кордовой и мобилизованной донорской крови, как альтернатив КМ [5, 10, 12].

Основными преимуществами трансплантации ГСК из мобилизованной донорской крови по сравнению с КМ являются, во-первых, снижение риска, связанного с серьезной хирургической процедурой забора КМ; во-вторых, сбор донорских ГСК может быть произведен в амбулаторных условиях. Недостатками следует считать необходимость введения донору гемопоэтических стволовых факторов и необходимость проведения донору нескольких заборов крови.

В последнее время альтернативным источником гемопоэтических стволовых клеток-предшественников все чаще выступает кордовая кровь. Было показано, что содержание ранних и коммитированных клеточных предшественников [11], а также количество КОЕ-ГМ и их пролиферативный потенциал в КК выше по сравнению с ДК взрослых людей даже после введения ростовых факторов [6]. Однако недостатком кордовой крови можно считать ограниченное количество ГСК, получаемых при единичной заготовке, а также невозможность повторного сбора [11].

Повышение частоты использования для трансплантации ГСК крови, которые входят в состав ядродержащих клеток (ЯСК), стало предпосылкой к созданию банков крови, где образцы хранятся в жидком азоте (при -196°C) в течение длительного времени без потери биологической полноценности.

Все ядродержащие клетки, имея сложную внутриклеточную структуру, нуждаются в индивидуальном подборе режима замораживания и оттаивания, что справедливо в том числе и в отношении лейкоцитов, для которых необходимо учитывать процессы, протекающие при кристаллизации воды, изменения их органелл, а также состав защитного раствора (криопротектора) и режима замораживания. Многими авторами предложены технологии замораживания лейкоцитов для их длительного хранения, однако, несмотря на большое количество работ, посвященных изучению этого вопроса, а также изучению механизмов криоповреждения и криозащиты лейкоцитов крови человека, проблема сохранения функциональной активности лейкоцитов после криоконсервирования далека от окончательного разрешения [1, 3, 7, 14].

Учитывая небольшие объемы КК и трудности, связанные с получением ГСК из ДК, на передний план выступает необходимость сохранения максимального количества клеток без потери их пролиферативной активности и жизнеспособности, что приводит к разработке новых и усовершенствованию имеющихся методов криоконсервирования клеток.

Одним из важных этапов процедуры криоконсервирования ядродержащих клеток (ЯСК) является их выделение из цельной крови, поскольку эритроциты при замораживании и отогреве разрушаются и продукты лизиса могут в дальнейшем приводить к неблагоприятным реакциям у реципиента. Разработка наиболее оптимального метода выделения ЯСК из цельной крови и оценка их структурно-функционального состояния на этом этапе позволит предотвратить замораживание заведомо поврежденных клеток, что может негативно отразиться на их качестве после замораживания-отогрева и, как следствие, несостоятельности деконсервированного препарата ЯСК.

В связи с этим **целью исследования** было сравнить эффективность выделения ЯСК из цельной кордовой и донорской крови, а также оценить их жизнеспособность и степень нарушения асимметрии мембран при различных методах выделения.

Объект и методы исследования. Объектом исследования служили ядросодержащие клетки донорской и кордовой крови человека.

В работе использовалась кордовая и донорская кровь, заготовленная на глюкозо-цитратном растворе. Сбор КК производили после получения информированного согласия у беременной.

Выделение фракции ЯСК проводили несколькими методами:

- методом седиментации в полиглюкине (CONC 1);
- методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина (CONC 2);
- по разработанному нами методу двухэтапного центрифугирования цельной крови с последующим получением концентрата ЯСК в аутоплазме (CONC 3) [2].

Сохранность ЯСК определяли стандартным методом подсчета количества клеток в камере Горяева.

Определение фенотипа ядросодержащих (CD45+) клеток, оценку их жизнеспособности с использованием ДНК-маркера 7-аминоактиномицина D (7AAD), а также степень нарушения асимметрии мембран (по наличию фосфотидилсерина на внешней мембране) с использованием набора реагентов Annexin V-FITC detection KIT I фирмы BD, проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (США)) с использованием реагентов BD.

Результаты исследований и их обсуждение.

Поскольку эффективность клинического использования препаратов ЯСК определяется достаточным количеством клеток на килограмм массы реципиента, то актуальной задачей является выделение максимального количества ЯСК из цельной крови (ЦК) для их дальнейшего криоконсервирования. В связи с этим, нами была проведена оценка эффективности выделения клеток различными методами.

Было показано, что независимо от используемой крови (ДК или КК), наилучшим методом выделения является метод двухэтапного центрифугирования (CONC 3), который позволяет выделять 85,3±2,6 % CD45+-клеток из ДК и 90,6±1,3 % CD45+-клеток из КК соответственно (рис. 1). Метод седиментации в

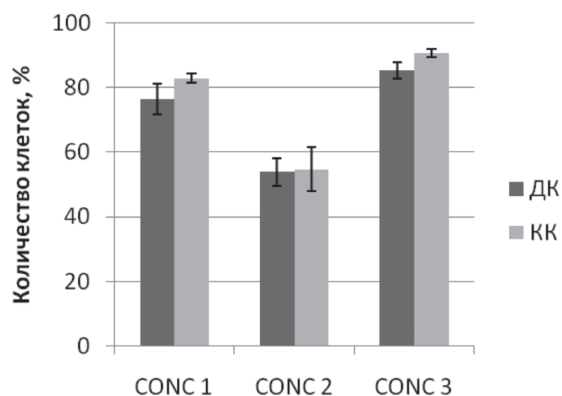


Рис. 1. Эффективность выделения ЯСК из кордовой (КК) и донорской крови (ДК) различными методами (CONC 1, 2, 3).

полиглюкине (CONC 1) также демонстрирует достаточно высокий процент выделения ЯСК, по сравнению с фиколлом, где наблюдается потеря порядка 45% потери клеток на этапе выделения, которая совпадает с литературными данными [11].

При оценке популяционного состава кордовой и донорской цельной крови отличий в процентном соотношении лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов выявлено не было (рис. 2). Выделение ядросодержащих клеток с использованием полиглюкина (CONC 1) и методом двухэтапного центрифугирования (CONC 3) не изменяет соотношение популяций в данных концентратах по сравнению с цельной кровью.

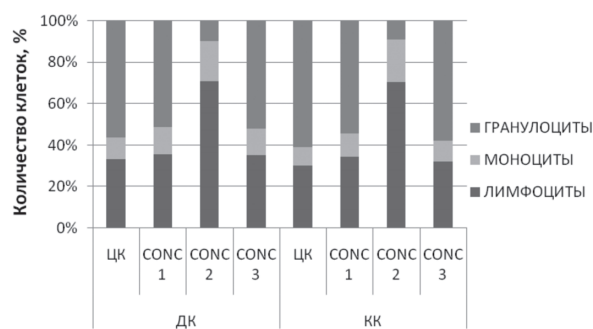


Рис. 2. Популяционный состав кордовой и донорской цельной крови (ЦК) и после выделения различными методами (CONC 1, 2, 3).

После выделения ЯСК из ЦК при использовании фиколла (CONC 2) наблюдались значительные отличия в популяционном составе концентрата, поскольку данный метод позволяет выделять преимущественно мононуклеарные клетки (рис. 2).

Как известно, любое внешнее воздействие на клетки (физическое, химическое или сочетанное) может негативно сказываться на состоянии клеток. В связи с этим, актуальным было оценить повреждение ЯСК, вызванные воздействиями методов выделения.

Одним из таких повреждений может быть нарушение целостности мембран и фрагментация ДНК клеток, которое можно оценить с использованием витального красителя 7-амино-актиномицина D (7AAD). Данный краситель является аналогом актиномицина D и связывается с цитозинными и гуаниновыми основаниями ДНК и образует высоко флуоресцентные аддукты (максимум эмиссии при 647 нм), которые идентифицируют клетки как "нежизнеспособные" (7AAD+-клетки) [13].

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 [8], служит сигнальным рецептором утилизации данных клеток макрофагами. Данные нарушения возможно выявить методом проточной цитофлуориметрии по связыванию FITC-меченого белка AnnexinV с ядросодержащими клетками (AnnexinV⁺-клетки), который обладает высокоспецифичным сродством к отрицательно заряженным фосфолипидам, в частности к фосфатидилсерину [4].

Было показано, что после выделения ЯСК полиглюкином и двухэтапным центрифугированием (CONC 1 и 3) снижение жизнеспособности ЯСК (рис.3А) и изменение в асимметричном распределении фосфолипидов в мембране (рис.3Б) не наблюдались относительно контроля в ЦК, а при выделении клеток фиколлом (CONC 2) отмечалось достоверное увеличение данных параметров (рис.3).

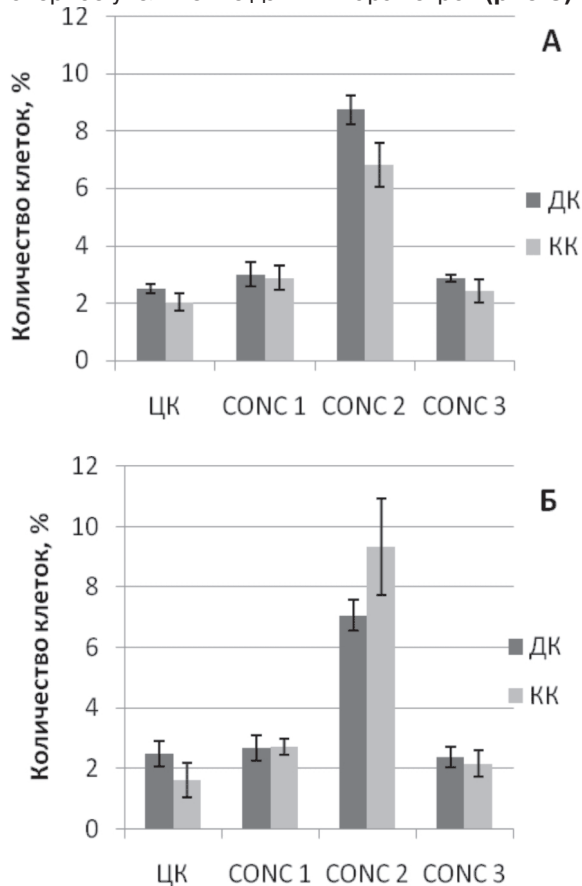


Рис. 3. Жизнеспособность (А) и степень нарушения асимметрии мембран (Б) ЯСК до и после выделения из донорской (ДК) и кордовой крови (КК) различными методами (CONC 1, 2, 3).

В дальнейших исследованиях был применен метод оценки стадий апоптоза клеток, основанный на использовании комбинации AnnexinV с окрашиванием витальным красителем [9]. В качестве витального красителя использовали 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: живые клетки

(AnnexinV⁺7AAD⁻-клетки), клетки находящиеся на начальной стадии апоптоза (AnnexinV⁺7AAD⁺-клетки), мертвые клетки, находящиеся на стадии позднего апоптоза/некроза (AnnexinV⁺7AAD⁺) и мертвые некротические клетки (AnnexinV⁻7AAD⁺) [9].

Оценка стадий апоптоза в ЯСК донорской и кордовой крови показала, что при выделении полиглюкином и двухэтапным центрифугированием (CONC 1 и 3) исследуемые показатели практически не отличаются от таковых в цельной кордовой и донорской крови соответственно.

При этом, после выделения концентрата ЯСК фиколлом (CONC 2) наблюдается наибольшее количество как мертвых некротических клеток, так и клеток, находящихся на начальной стадии апоптоза, что наиболее выражено для гранулоцитов (рис. 4).

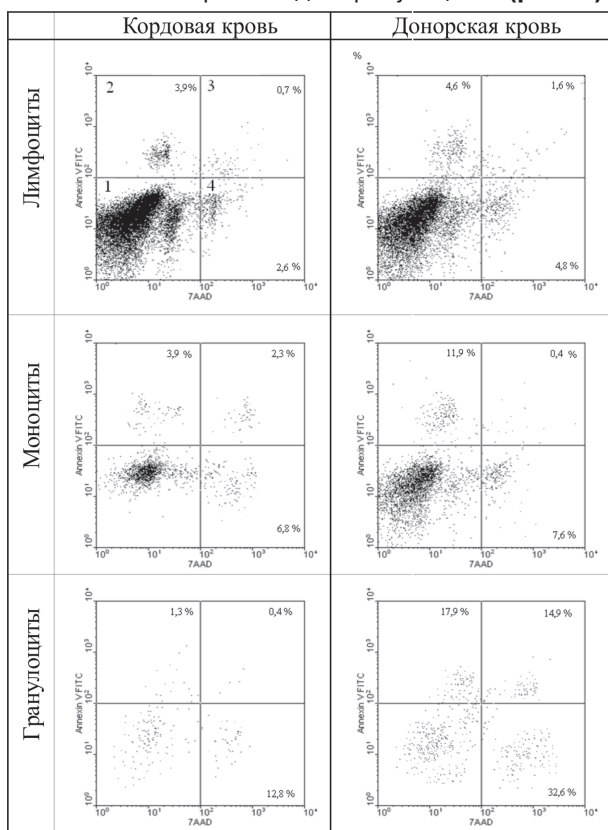


Рис. 4. Цитогаммы ЯСК кордовой и донорской крови после выделения фиколлом (CONC 2):

- 1 - нижний левый квадрант - AnnexinV⁺7AAD⁻-клетки;
- 2 - верхний левый квадрант - AnnexinV⁺7AAD⁺-клетки;
- 3 - верхний правый квадрант - AnnexinV⁻7AAD⁺-клетки;
- 4 - нижний правый квадрант - AnnexinV⁻7AAD⁻-клетки.

При других методах выделения данные показатели практически не отличаются от таковых для ЦК.

Как видно из рисунка 4, наибольшее количество клеток, находящихся на стадии позднего апоптоза/некроза приходится на ЯСК донорской крови. При этом количество AnnexinV⁺7AAD⁺-клеток в КК изменяется не значительно по отношению к ЦК (0ч3%).

Исходя из выше сказанного, наибольшее количество живых клеток (AnnexinV⁺7AAD⁻), наблюдается при их выделении из ЦК с использованием полиглюкина (CONC 1) и методом двухэтапного

центрифугирования (CONC 3). В тоже время, после выделения ЯСК в градиенте плотности фиколла происходит снижение количества AnnexinVІ7AAD-лимфоцитов в среднем на 10%, моноцитов – на 18%, а для гранулоцитов на $67 \pm 6,9\%$ и $36,5 \pm 9,9\%$ в ДК и КК соответственно.

Выводы. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что наиболее эффективными методами выделения ЯСК из цельной кордовой и донорской крови являются методы седиментации

в полиглюкине и двухэтапного центрифугирования, которые позволяют выделять наибольшее количество ЯСК, не вызывают нарушение асимметрии мембран и не снижают жизнеспособность клеток.

Перспективы дальнейших исследований.

В дальнейшей работе предполагается исследовать жизнеспособность и степень нарушения асимметрии мембран ядросодержащих клеток донорской и кордовой крови при различных методах криоконсервирования.

Список литературы

1. Бабийчук Л. А. Новые подходы к проблеме криоконсервирования гемопоэтических клеток кордовой крови человека / Л. А. Бабийчук, В. И. Грищенко, В. В. Рязанцев [и др.] // Укр. журн. гематол. і трансфузіол. – 2005. – № 4(д). – С. 122–123.
2. 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 та кріомедицини НАН України. – № 200700585; заявл. 22.01.07; опубл. 25.05.07, Бюл. №7
3. Сведенцов Е.П. Разработка нового метода сохранения жизнеспособных лейкоцитов в условиях околонулевых температур / Е.П. Сведенцов, Т.В. Туманова, О.О. Зайцева и др. // Казанский медицинский журнал. - 2008. - №4. - С.558-560.
4. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis / G. Koopman, C.P. Reutelingsperger, G.A. Kuijten [et al.] // Blood. - 1994. - Vol.84. - P. 1415-1420.
5. Broxmeyer H. E. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells / H. E. Broxmeyer, G. W. Gordon, G. Hangoc [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P.3828–3832.
6. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / S. Siena, M. Bregni, B. Brando [et al.] // Blood. - 1989. - 74, № 6. - P.1905-1914.
7. Effect of storage on stem cell concentration and viability in cord blood / W. Hubl, J. Iturraspe, C.E. Hutcheson [et al.] // Blood. - 1997. - Vol. 90. - P.326b.
8. Fadok V.A. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages / V.A. Fadok, D.R. Voelker, P.A. Campbell et al. // J. Immunol. - 1992. - Vol. 148. - P.2207-2216.
9. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases / J.F. Abrahamsen, A.M. Bakken, O. Bruserud [et al.] // Bone Marrow Transplant. - 2002. - Vol. 29. - P.165-171.
10. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling / E. Gluckman, H.E. Broxmeyer, A.D. Auerbach [et al.] // N. Engl. J. Med. - 1989. - Vol. 321. - P.1174-1178.
11. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells / H.E. Broxmeyer, G.W. Douglas, G. Hangoc [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1989. - Vol. 86. - P.3828-3832.
12. Knudtson S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood / S. Knudtson // Blood. - 1974. - Vol. 43. - P.357-361.
13. The use of 7-aminoactinomycin D identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques / N.J. Philpott, A.J. Turner, J. Scopes [et al.] // Blood. - 1996. - Vol. 87. - P.2244-2251.
14. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations / P. Halle, O. Tournilhac, W. Knopinska-Posluszny [et al.] // Transfusion. - 2001. - May; 41(5). - P.667-73.
15. Watt S.M. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential / S.M. Watt, M. Contreras // J. Seminars in fetal neonatal medicine. - 2005. - Vol. 10. - P.209-220.

УДК 611-018.5.013.8:615.014.41

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И СТЕПЕНИ НАРУШЕНИЯ АСИММЕТРИИ МЕМБРАН ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ ЦЕЛЬНОЙ КОРДОВОЙ И ДОНОРСКОЙ КРОВИ.

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

Резюме. Повышение частоты использования в клеточной терапии гемопоэтических стволовых клеток крови, которые входят в состав ядросодержащих клеток (ЯСК), стало предпосылкой к разработке технологий их криоконсервирования. Одним из важнейших этапов данной процедуры является выделение ЯСК из цельной крови и оценка их структурно-функционального состояния.

Целью исследования было сравнить эффективность выделения ЯСК из цельной кордовой и донорской крови, а также оценить их жизнеспособность и степень нарушения асимметрии мембран при различных методах выделения. Объектом исследования служили ядросодержащие клетки донорской и кордовой крови человека.

Проведенные исследования свидетельствуют, что наиболее эффективными методами выделения ЯСК из цельной кордовой и донорской крови являются методы седиментации в полиглюкине и двухэтапного центрифугирования, которые позволяют выделять наибольшее количество ЯСК, не вызывают нарушение асимметрии мембран и не снижают жизнеспособность клеток.

Ключевые слова: ядросодержащие клетки, кордовая и донорская кровь, жизнеспособность, асимметрия мембран.

УДК 611-018.5.013.8:615.014.41

ОЦІНКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА СТУПЕНЮ ПОШКОДЖЕННЯ АСИМЕТРІЇ МЕМБРАН ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН ПРИ РІЗНИХ МЕТОДАХ ЇХ ВИДІЛЕННЯ З ЦІЛЬНОЇ КОРДОВОЇ ТА ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ

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

Резюме. Підвищення частоти використання в клітинній терапії гемопоетичних стовбурових клітин крові, які входять до складу ядровісних клітин (ЯВК), стало передумовою до розробки технологій їх криоконсервування. Одним з найважливіших етапів даної процедури є виділення ЯВК з цільної крові і оцінка їх структурно-функціонального стану.

Метою дослідження було порівняння ефективності виділення ЯВК з цільної кордової та донорської крові, а також оцінка їх життєздатності і ступеню порушення асиметрії мембран при різних методах виділення. Об'єктом дослідження були ядровісні клітини донорської і кордової крові людини.

Проведені дослідження свідчать, що найбільш ефективними методами виділення ЯВК з цільної кордової та донорської крові є методи седиментації в поліглюкіні і двоетапного центрифугування, які дозволяють виділяти найбільшу кількість ЯВК, не викликають порушення асиметрії мембран і не знижують життєздатність клітин.

Ключові слова: ядровісні клітини, кордова та донорська кров, життєздатність, асиметрія мембран.

UDC 611-018.5.013.8:615.014.41

Estimation Of Viability And Membrane Lipid Asymmetry Of Nucleated Cells From Cord And Peripheral Blood Separated By Different Methods

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

Summary. Increasing the frequency of use in cell therapy of hematopoietic stem cells, being the part of nucleated cells (NCs), was a prerequisite for the development of technologies for their cryopreservation. One of the most important steps in this procedure is the separation of NCs from the whole blood and assessment of their structural and functional state.

The aim of this study was to compare the separation effectiveness of the NCs from the whole cord and peripheral blood, and to assess their viability and extent of the impairment of membranes lipid asymmetry with different separation methods. The research object was nucleated cells from peripheral and cord blood.

The studies suggest that the most effective methods of nucleated cells separation are the methods of sedimentation in polyglucinum and two-step centrifugation, enabling to separate the highest number of NCs, not cause an impairment of the membranes lipid asymmetry and did not decrease the cell viability.

Key words: nucleated cells, cord and peripheral blood, viability, membrane lipid asymmetry.

Стаття надійшла 30.11.2011 р.