



УДК 611-018.5.013.8:615.014.41

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

**Л.А. БАБИЙЧУК**  
**П.М. ЗУБОВ**  
**О.А. МИХАЙЛОВА**  
**В.В. РЯЗАНЦЕВ**

*Институт проблем криобиологии  
и криомедицины НАН Украины,  
г. Харьков*

*e-mail: miholya@mail.ru*

Разработанный метод криоконсервирования ядродержащих клеток кордовой крови, основанный на применении 5% ДМСО и новой четырехэтапной программы замораживания, позволяет минимизировать отрицательное воздействие физико-химических факторов криоконсервирования и сохранить до 85% CD45<sup>+</sup> и до 94% CD34<sup>+</sup>-клеток в жизнеспособном состоянии, не вызывая активации образования АФК в клетках. Установлено, что основные потери ядродержащих клеток происходят за счет популяции гранулоцитов.

Ключевые слова: кордовая кровь, ядродержащие клетки, криоконсервирование, жизнеспособность, активные формы кислорода, апоптоз.

**Введение.** Кордовая кровь (КК), как источник репопулирующих гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), в настоящее время достаточно часто используется в клинической практике для лечения патологий различного генеза [1, 2]. Преимущества в использовании препаратов КК, по сравнению с другими источниками ГСК, заключаются в высоком содержании некоммутированных гемопоэтических клеток, обладающих большим потенциалом пролиферации и экспансии, чем взрослый костный мозг, легкости получения данного материала, полной безопасности для матери и ребенка, а также отсутствию каких-либо этических противоречий [3].

В связи с высокой востребованностью в препаратах КК возникает необходимость создания банков, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии при температуре жидкого азота (-196°C) в течение длительного времени без потери их биологических свойств. Успешность функционирования криобанков во многом будет определяться используемыми методами сепарации клеток, их криоконсервирования и долгосрочного хранения. А оценка структурно-функционального состояния клеток позволит прогнозировать терапевтическую эффективность каждого препарата.

Исходя из выше сказанного целью работы была разработка эффективных методов сепарации, криоконсервирования и хранения клеток КК, а также комплексная оценка структурно-функциональной полноценности и жизнеспособности получаемого препарата на каждом этапе различными методами.

**Объекты и методы исследования.** Объект исследования – ядродержащие клетки (ЯСК) кордовой крови человека, заготовленной на глюкозо-цитратном растворе. Сбор КК производили после получения информированного согласия у роженицы.

Выделение фракции ЯСК из КК проводили методом седиментации в растворе декстрана Д-60. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 5%. Криоконсервирование клеток проводили в замораживателе фирмы Cryosan по специально разработанной нами четырехэтапной программе. Отогрев осуществляли на водяной бане при 37°C.

Количество сохранных ЯСК определяли стандартным методом с помощью камеры Горяева.

Фенотипирование ЯСК (CD45<sup>+</sup>) кордовой крови, в том числе и стволовых гемопоэтических (CD34<sup>+</sup>), их жизнеспособность (по связыванию с ДНК красителем 7-аминоактиномицином D (7AAD)) и оценку стадий апоптоза клеток (комбинация 7AAD и AnnexinV-FITC) до и после криоконсервирования проводилось методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (BD) (США) с использованием реагентов BD. Оценка продукции активных форм кислорода (АФК) в ЯСК определяли с использованием флуоресцентного зонда DCFH<sub>2</sub>-DA. Данные проточной цитофлуориметрии оценивали с помощью программного обеспечения фирмы BD – CELLQuest Pro.

Данные представлены в виде M±SE, достоверность различий между выборками оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с уровнем значимости 5%. Объем выборки составлял не менее 5 экспериментов.



**Результаты и их обсуждение.** Учитывая небольшие объемы КК (в среднем, не более 100 мл), очень важным являются как заготовка максимального количества крови, так и наиболее полное выделение ядросодержащих клеток (ЯСК) (в том числе и стволовых гемопоэтических) при сепарации с сохранением их структурно-функциональной полноценности. Поэтому с целью концентрирования ЯСК и удаления эритроцитов мы использовали седиментацию в полиглюкине, так как данный декстран имеет ряд преимуществ перед другими веществами (фиколл, желатин, гидроксипропилкрахмал и др.), применяющимися для выделения клеток. Полиглюкин, во-первых, как и аутологичная плазма КК, является наиболее благоприятной средой для функционирования ЯСК; во-вторых это легко доступный препарат, широко используемый в трансфузиологии и не требующий отмывания клеток перед применением.

Используемый в нашей работе метод седиментации полиглюкином позволил выделять более 80% ЯСК и ГСК из цельной КК (рис. 1).

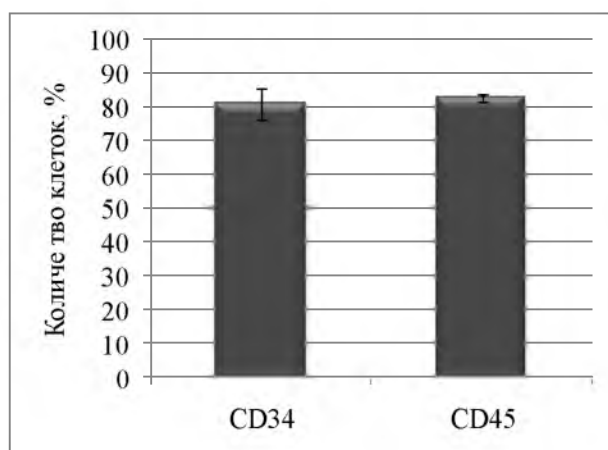


Рис. 1. Количество выделенных CD45<sup>+</sup>- и CD34<sup>+</sup>-клеток из цельной кордовой крови

Следует указать на то, что одним из важных параметров оценки эффективности метода выделения кроме «количественного выхода» клеток является оценка их жизнеспособности. В настоящее время в мировой практике наибольшее признание получил метод оценки жизнеспособности с использованием специальных ДНК красителей и проточной цитофлуориметрии.

Как видно из рис. 2, количество жизнеспособных (7-AAD<sup>-</sup>) CD34<sup>+</sup>- и CD45<sup>+</sup>-клеток после седиментации в декстране практически не отличается от количества жизнеспособных клеток в цельной кордовой крови.

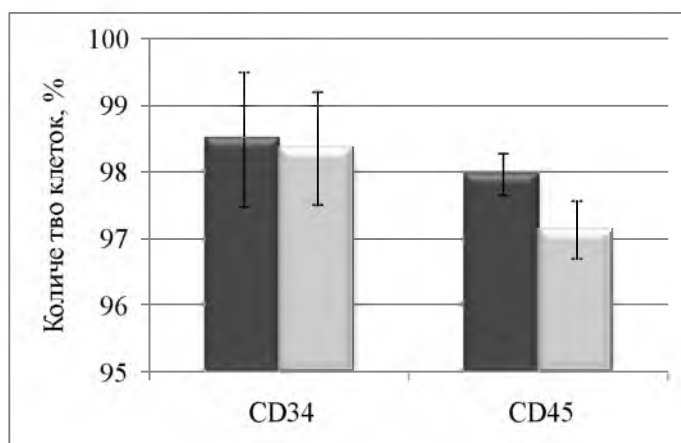


Рис. 2. Жизнеспособность CD34<sup>+</sup>- и CD45<sup>+</sup>-клеток в цельной кордовой крови (■) и после выделения декстраном (□)

В настоящее время широко используемым методом для криоконсервирования ЯСК КК является использование в качестве криопротектора ДМСО в конечной концентрации 7,5-10%. Однако, ДМСО должен удаляться перед инфузией в силу своей токсичности. Удаление криопротектора после размораживания клеточной взвеси существенно усложняет процедуру полу-



чения качественных деконсервированных клеток и приводит к потере части клеток, в том числе и ГСК (до 20%) в процессе отмывания, что в свою очередь снижает клиническую эффективность препаратов КК. В связи с вышеизложенным, для криоконсервирования ЯСК КК необходимо использовать ДМСО в минимально допустимых концентрациях, что позволит избежать токсические проявления и вводить клеточную суспензию реципиентам без отмывания от криопротектора.

Разработанный нами метод криоконсервирования ЯСК КК заключается в предварительном концентрировании клеточной суспензии и медленном добавлении на холоду раствора ДМСО [4]. Разработанная четырехэтапная программа замораживания в сочетании с предлагаемым методом предобработки суспензии клеток позволяет снизить концентрацию ДМСО до 5% и получить после размораживания высокий процент жизнеспособных клеток [5].

Было показано (рис. 3), что обработка криопротектором практически не снижала сохранность и жизнеспособность ЯСК и ГСК: более 90% клеток оставались в жизнеспособном состоянии. Последующее замораживание – отогрев позволяло сохранить порядка 80% CD45-клеток и до 90% CD34-клеток. При этом, жизнеспособность как ЯСК, так и ГСК оставалась на высоком уровне (рис.3).

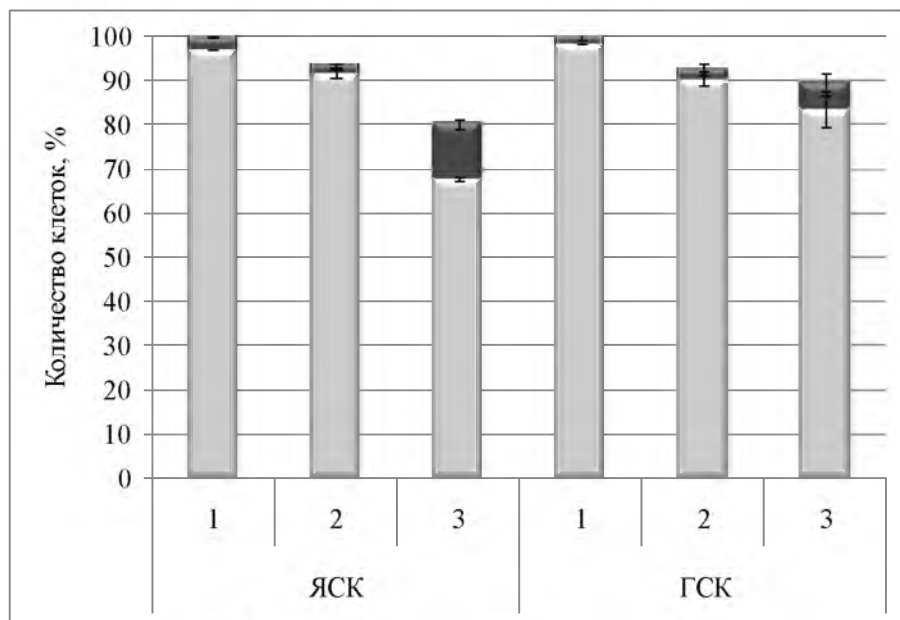


Рис. 3. Сохранность (■) и жизнеспособность (□) ЯСК и ГСК КК после выделения (1), обработки ДМСО (2) и замораживания-отогрева (3)

При оценке качества клеточных препаратов, кроме контроля количественных и качественных показателей популяции ГСК, не меньшее внимание должно быть уделено и состоянию других популяций ЯСК: лимфоцитам, моноцитам и гранулоцитам. Поскольку известно, что функциональная полноценность ГСК в значительной степени определяется гуморальными регуляторами (цитокины, гликозаминогликаны и др), вырабатываемыми клетками гемопозиндуцирующего микроокружения (лимфоцитами, макрофагами, нейтрофилами и т.п.) [6, 7].

Анализ перераспределения популяционного состава CD45<sup>+</sup>-клеток показал, что процессы выделения и обработки криопротектором не приводят к достоверному изменению процентного содержания популяций в пробах (рис. 4). В то время как после замораживания основные потери клеток происходят в основном за счет гранулоцитов, а относительное содержание лимфоцитов и моноцитов увеличивается (рис. 4).

В следующей серии экспериментов была проанализирована жизнеспособность популяций ЯСК после криоконсервирования. Видно (рис. 5), что снижение данного показателя у общей популяции CD45<sup>+</sup>-клеток происходило в основном за счет гранулоцитов, жизнеспособность которых составляла 69.8±3.7%. Жизнеспособность мононуклеаров при этом составляла 94-98%.

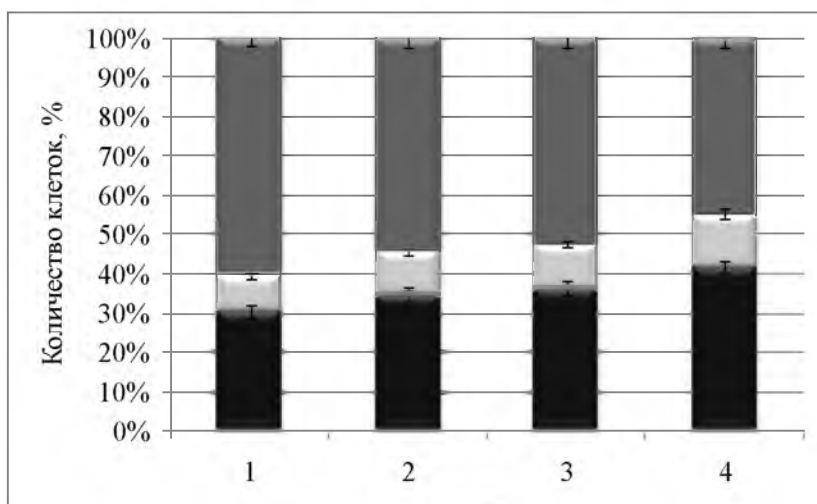


Рис. 4. Содержание лимфоцитов (■), моноцитов (▒) и гранулоцитов (■) кордовой крови до и после криоконсервирования.

Примечание: 1 – ЯСК цельной КК, 2 – ЯСК, выделенные декстраном, 3 – ЯСК, обработанные ДМСО, 4 – ЯСК после замораживания-отогрева.

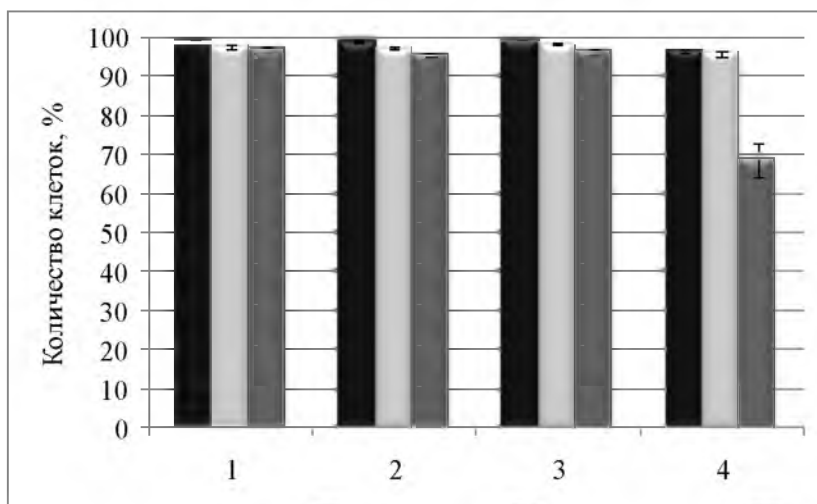


Рис. 5. Жизнеспособность лимфоцитов (■), моноцитов (▒) и гранулоцитов (■) кордовой крови до и после криоконсервирования.

Примечание: 1 – ЯСК цельной КК, 2 – ЯСК, выделенные декстраном, 3 – ЯСК, обработанные ДМСО, 4 – ЯСК после замораживания-отогрева

Процесс криоконсервирования как на стадии обработки криопротектором, так и непосредственно при замораживании-отогреве, помимо разрушения плазматической мембраны с последующим некрозом, вызванным формированием внутриклеточного льда и действием осмотического стресса, может вызывать гибель клеток и путем апоптоза. В связи с этим, в наших дальнейших исследованиях был применен метод оценки стадий апоптоза/некроза клеток, основанный на использовании комбинации AnnexinV с окрашиванием витальным красителем 7AAD [8]. Данный метод позволяет идентифицировать четыре типа клеток: живые клетки (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>-клетки), клетки находящиеся на начальной стадии апоптоза (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>-клетки), мертвые клетки, находящиеся на стадии позднего апоптоза/некроза (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) и мертвые некротические клетки (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup>) [8].

Оценка стадий апоптоза/некроза в ЯСК КК показала, что после выделения декстраном и обработки клеток криопротектором исследуемые показатели практически не отличались от таковых в цельной кордовой крови (табл.).



Таблица

**Количество клеток, находящиеся на различных стадиях апоптоза/некроза после замораживания-отогрева, %.**

Группы ЯСК \ Стадии апоптоза	AnnexinV <sup>-</sup> 7AAD <sup>-</sup>	AnnexinV <sup>+</sup> 7AAD <sup>-</sup>	AnnexinV <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup>	AnnexinV <sup>-</sup> 7AAD <sup>+</sup>
ЯСК цельной КК	96.79± 0.71	1.18± 0.5	0.41± 0.17	1.61± 0.18
ЯСК, выделенные декстраном	95.45± 0.25	1.68± 0.35	1.04± 0.58	1.83± 0.41
ЯСК, обработанные ДМСО	95.11± 0.83	2.76± 0.53	0.13± 0.12	1.99± 0.55
ЯСК после замораживания-отогрева	79.28± 1.24	5.19± 1.23	2.16± 0.88	13.37± 1.30

Примечание: данные представлены в виде М±SE.

После замораживания-отогрева ЯСК видно (табл.), что большая их часть оставалась неповрежденной (AnnexinV<sup>-</sup> 7AAD<sup>-</sup>-клетки).

Анализ поврежденных клеток в препарате показал, что у большей их части наблюдалось нарушение целостности мембраны и фрагментацией ДНК при сохранении в ней упорядоченности фосфолипидов, что характерно для стадии некроза (AnnexinV<sup>-</sup> 7AAD<sup>+</sup>). Таким образом, видно, что основные потери клеток происходят в результате их быстрой гибели под влиянием повреждающих факторов замораживания-отогрева, на которые клетки не могут или же не успевают отреагировать с помощью своих защитных систем.

В физиологически полноценной клетке АФК образуются постоянно, но их уровень в норме невысокий, так как клетка инактивирует их с помощью антиоксидантной системы. Поэтому, АФК, образующиеся в процессе нормального клеточного метаболизма, в основном из-за небольшой утечки электронов в дыхательной цепи митохондрий, а также других окислительно-восстановительных реакций в органеллах и цитоплазме, не вызывают повреждения клетки. Однако уровень АФК, превышающий защитные возможности клетки, может вызывать нарушения митохондрий и, как следствие, истощение АТФ и активацию ферментов лизосом, что приводит к разрушению клетки.

В связи с этим, в дальнейшей серии экспериментов была проведена оценка уровня АФК на всех этапах криоконсервирования. Поскольку в физиологически стабильной клетке содержание АФК находится на постоянном уровне, то любые изменения интенсивности флуоресценции в исследуемых группах ЯСК сопоставлялись с базовым уровнем АФК в нативных клетках цельной КК (контроль).

Проведенный анализ показал, что интенсивность флуоресценции DCF ЯСК после выделения существенно не отличалась от показателей цельной КК (рис.6).

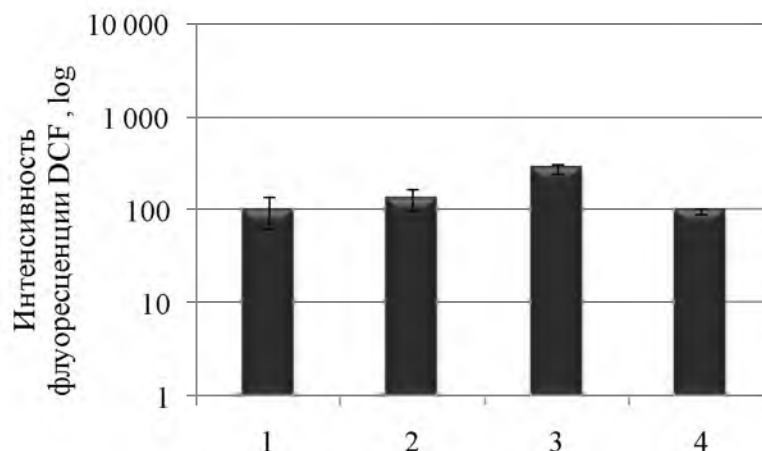


Рис. 6. Интенсивность флуоресценции DCF в процессе криоконсервирования

Примечание: 1 – ЯСК цельной КК, 2 – ЯСК, выделенные декстраном, 3 – ЯСК, обработанные ДМСО, 4 – ЯСК после замораживания-отогрева.

Обработка концентрата ЯСК криопротектором приводила к повышению уровня внутриклеточных АФК, что выражалось в изменении интенсивности свечения DCF в исследуемых клеточных препаратах по сравнению с уровнем до обработки.



Интенсивность флуоресценции DCF после криоконсервирования ЯСК была ниже по сравнению с показателями после обработки и соответствовала контрольным значениям в цельной КК. Данное снижение количества АФК в клетках после замораживания-отогрева может быть связано как с активацией ферментов антиоксидантной защиты (каталаза, GS-пероксидаза, СОД), в результате чего процесс образования АФК в клетке замедляется [9], так и с нарушением эстеразной энзиматической активности внутри клетки, в результате чего DCFH<sub>2</sub>-DA не преобразуется в активную форму DCFH<sub>2</sub>. Кроме того, возможно увеличение скорости рециклинга NADPH/NADP при участии NADP-оксидазы в данных экспериментальных условиях, что снижает цитозольную концентрацию АФК, поскольку известно, что клеточное окисление DCFH<sub>2</sub>-DA осуществляется двумя энзиматическими H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-генерирующими системами – глюкооксидазной и ксантинооксидазной [9, 10].

**Заключение.** Метод криоконсервирования ЯСК КК, основанный на применении 5% концентрации проникающего криопротектора ДМСО и специально разработанной четырехэтапной программы замораживания, позволяет минимизировать отрицательное воздействие физико-химических факторов криоконсервирования и сохранять до 85% CD45<sup>+</sup> и до 94% CD34<sup>+</sup>-клеток в жизнеспособном состоянии и не приводит к активации образования АФК в клетке. При этом основные потери ЯСК происходят за счет популяции гранулоцитов.

Оценка стадий апоптоза/некроза в ЯСК КК, криоконсервированных разработанным методом, показала, что 80% клеток остаются неповрежденными (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>-клетки), а основная гибель клеток происходит путем некроза (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup>-клетки).

### Литература

1. Long G.D., Laughlin M., Madan B. et al. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2003. -Vol. 9, № 12. – P. 772-780.
2. Gluckman E. Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling // *N. Engl. J. Med.* – 1989. – Vol. 321, № 17. – P. 1174-1178.
3. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопоэтического потенциала // *Трансфузиология.* – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 15-33.
4. Пат. 92227 Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – №200814009; заявл. 05.12.2008; опубл. 11.10.2010, Бюл.№19, 2010.
5. Бабійчук Л.А., Зубов П.М., Рязанцев В.В., Зубова О.Л. Криоконсервирование гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови для клинической практики // *Вестник неотложной и восстановительной медицины.* – 2012. – Том 13, № 1. – С. 19-22.
6. Гольцев А.Н., Лупенко Е.Д. Криоконсервирование как возможный метод оценки роли компонентного состава миелотрансплантата в проявлении функциональной активности кроветворных клеток // *Пробл. кріобіології.* – 1994. – № 1. – С. 3-13.
7. Cicuttini F.M., Loudovaris M., Boyd A.W. Interactions between purified human cord blood haemopoietic progenitor cells and accessory cells // *Br. J. Haematol.* – 1993. – Vol. 4, № 1. – P. 365-373.
8. Abrahamsen J.F., Bakken A.M., Bruserud O. et al. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases // *Bone Marrow Transplant.* – 2002. – Vol. 29. – P. 165-171.
9. Дамбаева С. В., Мазуров Д. В., Пинегин Б. В. Оценка продукции активных форм кислорода методом лазерной проточной цитометрии в клетках периферической крови человека // *Иммунология.* – 2001. – № 6. – С. 58-61.
10. Bass D. A., Parce J. W., Dechatelet L. R. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation // *J. Immunol.* – 1983. – Vol. 130. – № 4. – P. 1910-1917.

## STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE AND VIABILITY OF CORD BLOOD NUCLEATED CELLS AFTER CRYOPRESERVATION

**L.A. BABIJCCHUK  
P.M. ZUBOV  
O.O. MYKHAILOVA  
V.V. RYAZANTSEV**

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

*e-mail: mixolya@mail.ru*

The developed method for cord blood nucleated cells cryopreservation, based on the application of 5% DMSO and new four-step freezing program, allows to minimize negative effects of physical and chemical factors of cryopreservation and save up to 85% CD45<sup>+</sup> and 94% CD34<sup>+</sup>-cells in a viable state without causing reactive oxygen species activation. It was established that the major loss of nucleated cells occurred due to a population of granulocytes.

Keywords: cord blood, nucleated cells, cryopreservation, viability, reactive oxygen species, apoptosis.