

Выявление технологических и прогностических факторов, определяющих качество образцов стволовых клеток пуповинной крови

И.В. Высочин¹, А.А. Исаев¹, М.А. Лагарькова², Г.А. Космиади³, С.Л. Киселев²

¹Гемабанк

²Институт биологии гена РАН

³ГУ НИИ Туберкулеза РАМН, Москва

Ключевые слова: стволовые клетки, криоконсервирование, пуповинная кровь.

Показана зависимость качественных и количественных характеристик образцов гемопоэтических стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови, от технологических и прогностических факторов.

Пуповинная кровь (ПК) является безопасным, емким источником стволовых клеток, обладающих большим пролиферативным потенциалом и эффективно используемых для лечения онкологических заболеваний человека. В связи с этим во многих странах мира создаются банки пуповинной крови, обеспечивающие криогенное хранение клеток. Важными показателями, определяющими пригодность трансплантата для лечения, является количество ядросодержащих клеток, а также клеток с фенотипом CD 34⁺. Так, для успешной трансплантации клеток пуповинной крови необходимо $3,7 \times 10^7$ ядросодержащих клеток на 1 кг веса тела реципиента или $3,3 \times 10^5$ клеток с иммунофенотипом CD 34⁺/кг [1]. В последние годы обсуждаются перспективы клинического применения CD 133⁺ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) как альтернатива CD 34⁺. В экспериментах *in vitro* показано, что клетки CD 133⁺ имеют больший пролиферативный потенциал и являются более ранними гемопоэтическими предшественниками, чем CD 34⁺ [2].

Количество ГСК, по данным Wong и соавт., прямо пропорционально объему ПК, который определяется техникой и временем сбора крови [3]. В литературе приводятся противоречивые данные о влиянии антропометрических показателей матери и новорожденного, а также условий криогенного хранения на количество и жизнеспособность ГСК [3, 4]. Последнее обусловлено тем, что, несмотря на общий протокол криоконсервирования и криогенного хранения клеток, некоторые банки используют свои оригинальные методики. Так, Гемабанк осуществляет криогенное хранение стволовых клеток пуповинной крови в соответствии с методикой, разработанной и утвержденной в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и Гематологическом НЦ РАМН.

Таким образом, основной задачей банков, в том числе и Гемабанка, является сбор максимального объема пуповинной крови, выделение и сохранение в жизнеспособном состоянии стволовых клеток с минимальными потерями.

Данные процедуры необходимо проводить с учетом прогностических и технологических факторов, определение которых и является целью исследований. Настоящая работа является лишь первым этапом и предусматривает решение следующих задач:

- выделить, идентифицировать и определить количество ядросодержащих клеток, клеток с фенотипом CD 34⁺ и CD 133⁺;

- оценить влияние криоконсервирования на жизнеспособность гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови;
- провести поиск и определить факторы, оказывающие влияние на содержание стволовых клеток в пуповинной крови.

Материалы и методы

Для решения первой задачи, а также оценки сохранности стволовых клеток начата экспериментальная работа, рассчитанная на несколько десятков лет. Подготовлены и проанализированы образцы нативного и криоконсервированного материала, а также заложены на длительное криогенное хранение образцы для определений в течение всего периода наблюдения.

Криоконсервирование образцов стволовых клеток пуповинной крови в Гемабанке проводили в три этапа [1].

1. Выделение клеточной фракции. Для осаждения эритроцитов смешивали декстран с пуповинной кровью в соотношении 1:1. Седиментация эритроцитов длилась 50–60 мин. Супернатант концентрировали центрифугированием в течение 10 мин при 2000 об/мин. Удаляли плазму и доводили объем клеточной суспензии до 25–30 мл.

2. Добавление криофиликта к клеточной суспензии. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО). К полученной клеточной суспензии приливали (при постоянном перемешивании) равный объем декстрана с ДМСО. Концентрация ДМСО в клеточной суспензии составляла 5–6%.

3. Замораживание клеток. Материал замораживали в диапазоне температур от 0 до 40°C со скоростью охлаждения 1,1°/мин. Через 1–2 часа от начала замораживания криопробирки помещали в жидкий азот.

Сохранность стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови, оценивали по показателям: количество ядросодержащих клеток, клеток с фенотипом CD34⁺ и CD133⁺, а также жизнеспособность клеток. Содержание ядросодержащих клеток определяли на гематологическом анализаторе ACT-10 (Beckman-Coulter, США), работающем по принципу: подсчет и распределение клеток по размеру.

Методами иммуноцитохимического анализа определяли количество клеток с фенотипом CD 34⁺ и CD 133⁺.

1. Клетки фиксировали на обработанных полилизинном предметных стеклах 5 мин при – 20°C в 100% метаноле (Sigma).

2. Промывали PBS (буферный раствор) 2 раза. Блокировали неспецифическую сорбцию антител инкубацией в течение 30 мин в растворе PBS–0,1% Tween 20, содержащем 10% FBS, 5% сыворотки козы при комнатной температуре.

3. Первичные антитела (Мышинные моноклональные против CD 34⁺ (BD Bioscience) и мышинные моноклональные против CD 133⁺ (Miltenyi Biotec) наносили в разведениях 1:100 и 1:50 соответственно, в PBS–0,1%Tween–20. Инкубировали 1 час при комнатной температуре.

4. Отмывали 3 раза по 5 мин в PBS–0,1%Tween 20.

5. Вторичные антитела (goat anti–mouse Alexa Fluor 488 или 546 Ig (Molecular Probes) наносили в разведениях 1:1000 – 1:500, инкубировали 30 мин при комнатной температуре.

6. Отмывали 3 раза по 5 мин в PBS–0,1% Tween 20.

7. Инкубировали с DAPI (клатратный краситель: 4,6–диамидино–2–фенилиндол) 0,1 мкг/мл в PBS 10 мин для окраски ядер.

8. Отмывали 1 раз в PBS.

9. Закрывали в Mowiol (Sigma) под покровное стекло.

Жизнеспособность клеток до и после криоконсервирования оценивали микроскопическим методом [5]. Для этого криопробирки с замороженными образцами нагревали до +37°C на водяной бане до исчезновения кристаллов льда. Затем клетки переносили в пробирку, содержащую 9 мл теплой среды, центрифугировали 5 мин при 500 g, супернатант удаляли, осадок разбавляли в 10 мл среды. Раствор красителя: акридиновый оранжевый и бромистый этидий (Sigma) (по 100 мкг/мл каждого в PBS) – приливали к равному объему клеточной суспензии. Подсчет клеток (зеленые – живые, а оранжевые – нежизнеспособные) проводили в камере Горяева под флуоресцентным микроскопом (Leica DMR).

Результаты и обсуждение

После проведенного анализа клеточного материала до и после криоконсервирования (1–2 сутки от начала криогенного хранения) получили следующие результаты (табл.).

В результате проведенной работы выделены и идентифицированы ядродержащие клетки (ЯСК), клетки с фенотипом CD 34⁺ и CD 133⁺. Показатели содержания ЯСК, CD34⁺ и CD133⁺ не изменились после криоконсервирования. Это позволяет говорить о сохранении геометрии клетки. Однако, судя по снижению показателя жизнеспособности, можно предположить нарушение целостности клеточной мембраны. Образцы содержат ядродержащие клетки и клетки с фенотипом CD 34⁺ в количестве, достаточном для трансплантации больному со средним весом 36 кг. В связи с тем, что показатели жизнеспособности до и после криоконсервации значительно не отличаются, можно предположить, что криогенное хранение не оказывает влияния на жизнеспособность клеток.

На втором этапе работы выявлены некоторые факторы, влияющие на содержание стволовых клеток в пуповинной крови. С этой целью проанализировано 300 образцов пуповинной крови. Средний объем собранной ПК составил 71,48±3,8 мл, количество ЯСК – 0,82±0,05410⁹, жизнеспособность – 93,47±0,37%. Определены следующие зависимости: зависимость количества CD 34⁺ и ЯСК от объема ПК (рис. 1, 2), а также объема ПК от веса новорожденного (рис. 3). Все зависимости прямо пропорциональны.

Таблица. Влияние криоконсервирования на стволовые клетки пуповинной крови

Показатели пуповинной крови	До криоконсервирования	После криоконсервирования (двое суток хранения)
Ядродержащие клетки, ×10 ⁹	1,19±0,49	1,19±0,49
CD 34 ⁺ , ×10 ⁷	0,38±0,08	0,38±0,08
CD 133 ⁺ , ×10 ⁷	0,16±0,05	0,16±0,05
Жизнеспособность, %	94±5,5	88±5,0

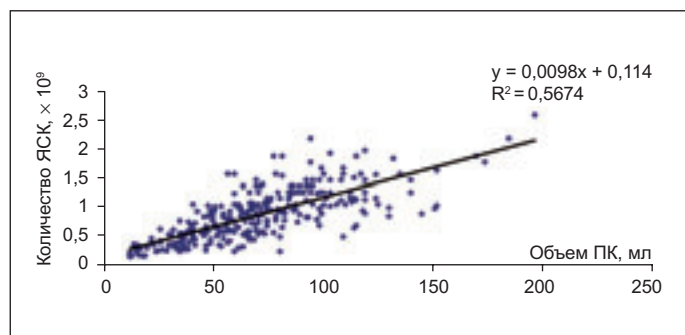


Рис. 1. Зависимость количества ядродержащих клеток (ЯСК) от объема пуповинной крови

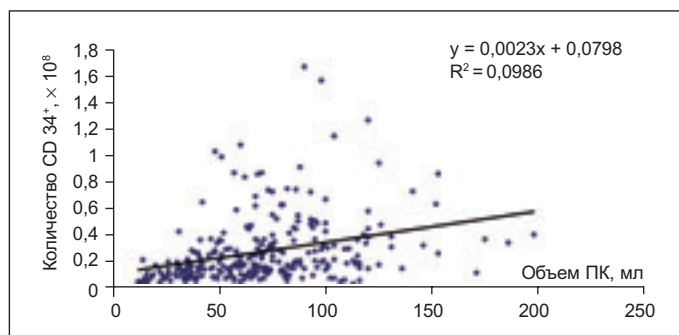


Рис. 2. Зависимость количества CD 34⁺ от объема пуповинной крови

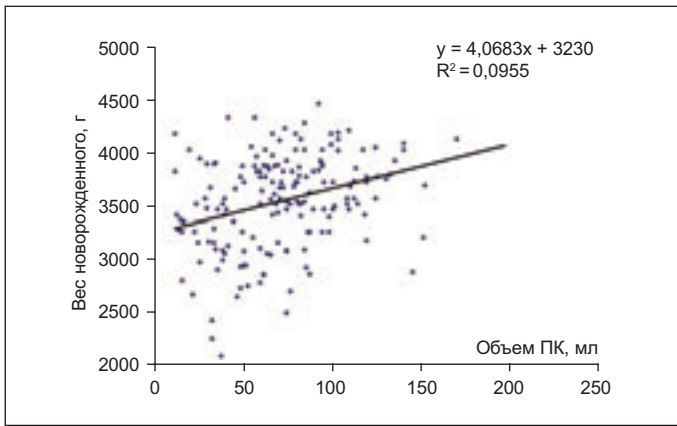


Рис. 3. Зависимость объема ПК от веса новорожденного

Заключение

Таким образом, в результате проведенной работы из образцов пуповинной крови выделены ЯСК, а также гемопоэтические стволовые клетки с фенотипом CD 34⁺ и CD 133⁺. Последние, имея более высокий пролиферативный потенциал и являясь более ранними предшественниками гемопоэза, могут заменить клетки CD 34⁺ и эффективно использоваться не только для восстановления гемопоэза, но и для кардиомио-

пластики, т.к. способны стимулировать ангиогенез (проявляют эндотелиальную прогениторную активность) [6].

Показано, что криоконсервирование не влияет на количество жизнеспособных ядродержащих и гемопоэтических стволовых клеток. Однако используемый иммуноцитохимический анализ не позволил оценить влияние криоконсервирования на изменение количества жизнеспособных CD34⁺ и CD133⁺ клеток. Вероятно, необходимо использовать более точные методы анализа.

Выявлены факторы, определяющие количество ядродержащих клеток и клеток с фенотипом CD 34⁺: объем пуповинной крови и вес новорожденного. Все зависимости прямо пропорциональны. Из этого следует, что наибольшее количество ЯСК и CD 34⁺клеток может быть выделено из пуповинной крови объемом более 70 мл у новорожденных с весом 3500 г и более.

Беременность, роды, сбор ПК и выделение стволовых клеток процесс многофакторный. Несмотря на общие закономерности и зависимости сохраняется принцип индивидуальности организма. Так, по нашим данным, даже из малого объема (40 мл) удается выделить более миллиарда ЯСК и несколько десятков миллионов CD 34⁺клеток. В связи с этим аллогенные стволовые клетки ПК, совместимые с организмом донора и обладающие большим пролиферативным потенциалом, необходимо выделять даже из малого объема ПК.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Энциклопедия клинической онкологии: Руководство для практикующих врачей. – М.: РПС-2005; 2005: 1356.
2. Биология AC 133⁺ клеток – новые данные. [http://celltranspl.ru/journal/news/?MESSAGES\[1\]=SHOW_NEWS&NEWS_ID=6](http://celltranspl.ru/journal/news/?MESSAGES[1]=SHOW_NEWS&NEWS_ID=6).
3. Atkinson K., Champlin R., Ritz J. et al. Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation. – Cambridge UK; New-York: Cambridge University Press; 2003: 2000.

4. Гришина В.В., Тимохина Е.В., Андреева Л.Ю. Система сбора и фракционирования стволовых клеток пуповинной крови. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии 2004; 3(6): 50–4.

5. Лимфоциты: Методы: пер. с англ. Под ред. Дж. Клауса. М.: Мир; 1990: 395.

6. Клеточная кардиомиопластика аутологичными CD 133⁺ клетками, мобилизованными в периферический кровоток. [http://celltranspl.ru/journal/news/?MESSAGES\[1\]=SHOW_NEWS&NEWS_ID=702](http://celltranspl.ru/journal/news/?MESSAGES[1]=SHOW_NEWS&NEWS_ID=702).