

УДК 611.018.5.013.8:615.014.41:547.42

Л.А. БАБИЙЧУК\*, О.В. КУДОКОЦЕВА, П.М. ЗУБОВ, В.В. РЯЗАНЦЕВ, О.Л. ЗУБОВА, Т.М. ГУРИНА

**Аутобанки пуповинной крови: методы криоконсервирования  
и тестирования**

UDC 611.018.5.013.8:615.014.41:547.42

L.A. BABIYCHUK\*, O.V. KUDOKOTSEVA, P.M. ZUBOV, V.V. RYAZANSEV, O.L. ZUBOVA, T.M. GURINA  
**Cord Blood Autobanks: Cryopreservation and Testing Methods**

Разработана технология криоконсервирования ядросодержащих клеток кордовой крови, которая позволяет снизить концентрацию ДМСО до 5%, обеспечить высокую сохранность и структурно-функциональную полноценность в препарате фракции мононуклеаров, в том числе и гемопоэтических стволовых CD34<sup>+</sup>-клеток.

**Ключевые слова:** пуповинная кровь, криоконсервирование, ядросодержащие клетки, гемопоэтические стволовые клетки.

Розроблена технологія криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, яка дозволяє знизити концентрацію ДМСО до 5%, забезпечити високу збереженість та структурно-функціональну повноцінність в препараті фракції мононуклеарів, у тому числі і гемопоетичних стовбурових CD34<sup>+</sup>-клітин.

**Ключові слова:** пуповинна кров, криоконсервування, ядровмісні клітини, гемопоетичні стовлові клітини.

There was developed the technology of the cord blood nucleated cell cryopreservation which allowed to reduce DMSO concentration till 5% and provide the high recovery and structural and functional integrity of the mononuclear cell fraction in the preparation including the hemopoietic CD34<sup>+</sup>-stem cells.

**Key-words:** cord blood, cryopreservation, nucleated cells, hemopoietic stem cells.

Первая трансплантация клеток пуповинной крови (ПК) в 1988 году стала началом ее клинического применения. В настоящее время трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пуповинной крови является общепринятым методом лечения многих онкологических и незлокачественных заболеваний системы крови. Спектр исследований клинического применения ПК достаточно широк при негематологических заболеваниях: инфаркт миокарда, инсульт, "ишемия" нижних конечностей, болезни Паркинсона и Альцгеймера, сахарный диабет и др. Идея такого нетрадиционного клинического применения возникла в связи с выявлением среди ядросодержащих клеток (ЯСК) пуповинной крови помимо ГСК (CD34<sup>+</sup>), определенной доли мультипотентных клеток (CD133<sup>+</sup>), которые можно индуцировать и дифференцировать в нейрональном, остеогенном, хондрогенном и гепатоцитарном направлениях [2].

Открытие уникальной способности дендритных клеток (ДК) пуповинной крови инициировать антигенспецифический иммунный ответ обусловило интерес к ним с точки зрения терапии заболева-

ний, протекающих с участием иммунной системы. Говоря о ДК и их роли в противоопухолевом надзоре, нельзя не отметить в этом процессе функциональной активности лимфоцитов, макрофагов, а также нейтрофилов.

Установлено, что ГСК пуповинной крови, вышедшие из фазы покоя, способны отвечать на дифференцировочные сигналы и давать начало гемопоэтическим и мезенхимальным предшественникам, требуя как непосредственных контактов со стромальными элементами, так и опосредованных через гуморальные регуляторы (цитокины, гликозаминогликаны), вырабатываемые клетками гемопоэзистимулирующего микроокружения (лимфоцитами, макрофагами, нейтрофилами и т.п.) [3].

В этой связи возникает необходимость полноценного выделения всех ЯСК пуповинной крови и долгосрочного хранения как стволовых, так и гемопоэзистимулирующих клеток ПК.

До настоящего времени исследователи старались сохранить только мононуклеарные клетки, в состав которых входили и CD34<sup>+</sup>-клетки. Это связано с тем, что приживление аллогенного транс-

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 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

плантата во многом зависит от присутствия в нем клеток с незрелым фенотипом, т. е. со сниженным абсолютным содержанием CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> Т-клеток и повышенным содержанием CD45RA<sup>+</sup> клеток, характеризующим их низкую иммуногенную активность [2].

Однако, принимая во внимание возрастающий интерес к аутотрансплантации и к созданию аутобанков, на наш взгляд, необходимо выработать методы, позволяющие выделить максимальное количество всех ЯСК (СК и клеток гемопоэза индуцирующего окружения) и сохранить в жизнеспособном состоянии гетерогенную по составу популяцию этих клеток после криоконсервирования.

Цель данной работы – разработка оптимальных для аутобанков способов выделения, криоконсервирования и тестирования ЯСК пуповинной крови.

### Материалы и методы

Сбор ПК производили после получения информированного согласия у беременной, которая проходила тщательный дородовой скрининг на наличие противопоказаний к донорству ПК. Эксфузию крови осуществляли закрытым способом в систему для забора крови с 25 мл антикоагулянта из пупочной вены при естественных родах после рождения ребенка и отделения его от плаценты зажимом.

Выделение фракции ЯСК из ПК проводили методом седиментации с последующим центрифугированием. В качестве криопротектора использовали ДМСО в конечной концентрации 5%. Замораживали клетки на программном замораживателе (Kyooson, Германия) по четырехэтапной программе [1]. Количественный состав сохраненных ЯСК кордовой крови оценивали стандартным методом. Фенотипирование ЯСК (CD45<sup>+</sup>) пуповинной крови, в том числе и гемопоэтических (CD34<sup>+</sup>) клеток до и после криоконсервирования проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием реагентов Becton Dickinson по международному ISHAGE протоколу. Жизнеспособность ЯСК до и после криоконсервирования оценивали с помощью флуоресцентного ДНК красителя 7AAD (BD), используя метод проточной цитометрии. Оценку клоногенной активности ГСК пуповинной крови проводили в среде Methocult H4434 (Stem Cell Technologies, Канада) согласно стандартной методике.

### Результаты и обсуждение

Исходя из современного опыта научно-исследовательских работ по долгосрочному культивированию СК пуповинной крови как для наращи-

вания общего количества ЯСК, так и получения клеточных популяций определенного типа дифференцировки (нейроклетки, остеобласты, гепатоциты и т.п.), можно установить степень необходимости присутствия в среде культивирования биологически активных веществ аутологичной для СК пуповинной крови плазмы (гормонов, цитокинов) и дифференцированных клеток, относящихся к клеткам кроветворного микроокружения и являющихся индукторами гемопоэза посредством межклеточных взаимодействий или опосредованных гуморальных контактов [3]. В связи с этим для аутобанков ПК необходимо разработать методы криоконсервирования и долгосрочного хранения не только ГСК, но и всех присутствующих в кордовой крови (КК) ядродержащих клеток, а также аутологичной плазмы.

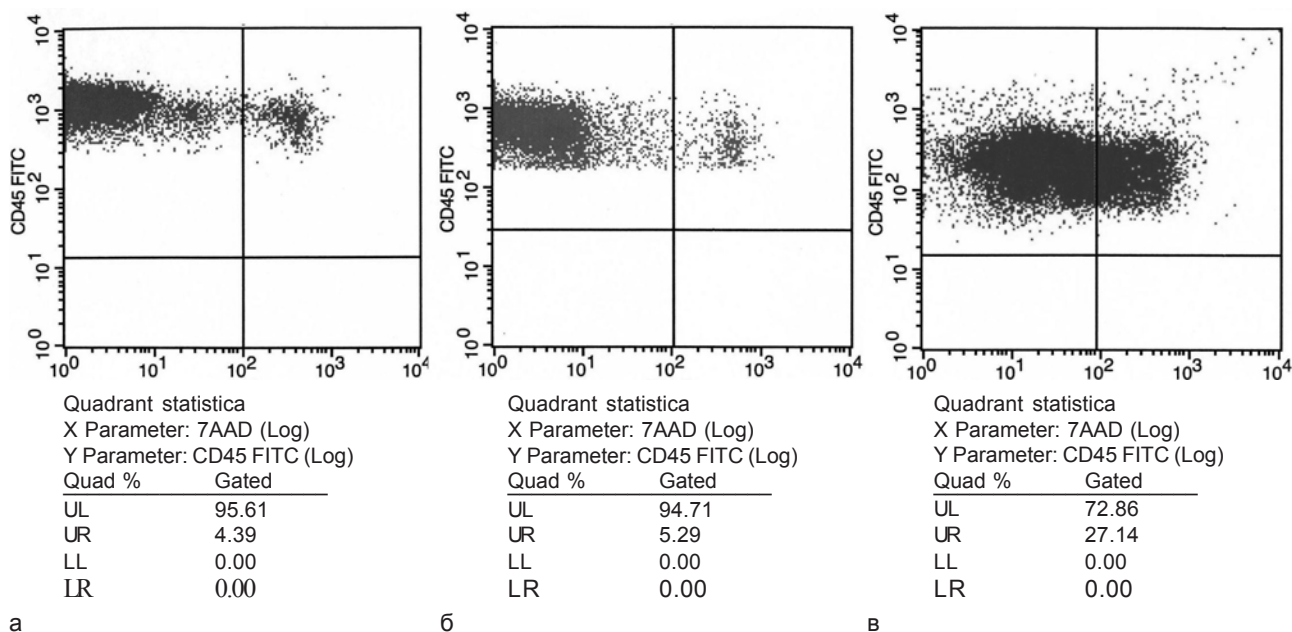
Разработанный нами способ выделения ЯСК пуповинной крови позволяет выделять до 80% всех ЯСК, сохраняя при этом их исходное процентное соотношение как в цельной ПК. Так, качественный состав выделенной взвеси ЯСК представлен следующими клетками: лимфоциты – 37±4; моноциты – 13±2, гранулоциты – 46±6%.

Важная задача аутобанков ПК – сохранение в жизнеспособном состоянии после криоконсервирования гетерогенной по составу популяции ЯСК пуповинной крови.

В настоящее время для криоконсервирования ядродержащих клеток ПК используется в качестве криопротектора ДМСО в конечной концентрации 7,5–10%, который должен быть удален до инфузии в силу своей токсичности. Удаление криопротектора после размораживания клеточной взвеси существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и приводит к потере части клеток в процессе отмывания, что снижает клиническую эффективность препаратов КК. Установлено, что основная токсичность, связанная с трансфузией ЯСК пуповинной крови, криоконсервированных с ДМСО, обусловлена дозозависимыми эффектами переливаемого ДМСО.

В связи с вышеизложенным, для криоконсервирования ЯСК пуповинной крови необходимо использовать ДМСО в минимально допустимых концентрациях (максимум 5%) при минимальном объеме инфузируемой суспензии ЯСК пуповинной крови, что позволит вводить клеточную суспензию реципиентам без отмывания от криопротектора.

Предлагаемый нами метод криоконсервирования ЯСК пуповинной крови заключается в предварительном концентрировании путем шадящего центрифугирования клеточной суспензии в объеме не более 3–5 мл и медленном добавлении на холоде раствора ДМСО на полиглюкине. Четы-



Жизнеспособность фракций ядросодержащих клеток: а – лимфоцитов; б – моноцитов; в – гранулоцитов.

рехэтапная программа замораживания в сочетании с предлагаемым методом предобработки суспензии клеток позволяет снизить концентрацию ДМСО до 5% и получить после размораживания высокий процент жизнеспособных клеток (до 85% CD45<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup> и до 99% CD34<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup> клеток). Следует отметить, что жизнеспособность общей популяции CD45<sup>+</sup>-клеток снижается в основном за счет гранулоцитов, жизнеспособность которых составляла 69,8±3,7%, мононуклеаров – 94–98% (рисунок).

При культивировании в полутвердой среде выявлен рост колоний всех типов (CFU-E, BFU-E, CFU-G, CFU-M, CFU-GM, CFU-GEMM). Суммарное количество колоний составляло 387±106, что коррелировало с процентом CD34<sup>+</sup>-клеток в образцах ПК.

### Вывод

Разработана технология криоконсервирования ЯСК пуповинной крови, которая позволяет снизить концентрацию ДМСО до 5%, обеспечить высокую

сохранность и структурно-функциональную полноценность в препарате фракции мононуклеаров, в том числе и гемопоэтических стволовых CD34<sup>+</sup>-клеток.

### Литература

1. Бабийчук Л.А., Кудокоцева О.В., Рязанцев В.В. и др. Новые перспективы в криоконсервировании ядросодержащих клеток кордовой крови // Гематология і переливання крові (міжвідомчий збірник).– 2008.– №34.– С. 17–21.
2. Исаев А.А., Мелихова В.С. Применение клеток пуповинной крови в клинической практике // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.– 2008.– Т. 3, №1.– С. 34–43.
3. Цуцаева А.А., Кудокоцева О.В., Щеглов А.В., Тупчиенко Г.С. Влияние моноцитов-макрофагов на колониобразующую активность нативных и криоконсервированных кровяных клеток // Гематология и трансфузиология.– 2002.– №1.– С. 22–24.

Поступила 28.08.2008