

УДК 62-9

Современные способы криоконсервации стволовых клеток пуповинной крови для общественного регистра доноров

Д. А. ИВОЛГИН, д-р мед. наук А. Б. СМОЛЯНИНОВ

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова
195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47

Д-р биол. наук Ш. М. БАГАУТДИНОВ

Военно-медицинская академия МО РФ

190013, Санкт-Петербург, Загородный пр., 47

К. В. КОРОВИНА, К. В. ШУНЬКИНА, А. В. СМИРНОВА

Покровский банк стволовых клеток

199106, Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 85

In this study changes of quality characteristics of 85 umbilical cord blood units during cryopreservation, thawing and washing of cryoprotector were studied. It was established that method used for umbilical cord blood cryopreservation and a method of cells washing with the help of automated system provides the best quality characteristics of umbilical cord blood units.

Key words: cryopreservation, cryoprotectant, hematopoietic stem cells, cord blood, viability, long-term storage.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротектор, гемопоэтические стволовые клетки, пуповинная кровь, жизнеспособность, длительное хранение.

В настоящее время применение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пуповинной крови (ПК) для лечения широкого спектра злокачественных и незлокачественных заболеваний получает все большее распространение. Начало масштабным исследованиям, подтверждающим что ПК может быть потенциальным источником пригодных для трансплантации ГСК, положила успешная трансплантация ПК, осуществленная 6 октября 1988 г. [1].

Криоконсервация традиционно применяемых источников ГСК — костного мозга (КМ) и периферической крови для терапевтического использования проводится более 30 лет, те же алгоритмы применяются и для длительного хранения ПК. Оптимальная криоконсервация, определяемая по потенциалу приживления (энграфтмента), и получение жизнеспособных ГСК зависят от ряда параметров, некоторые из которых мы рассмотрим более подробно.

Обработка перед криохраниением

До недавнего времени ни у кого не вызвала сомнения предложенная в 1995 г. Rubinstein P. необходимость сокращения объема собранной ПК, т. е. удаления плазмы и большей части эритроцитарной массы для оптимизации хранилища, уменьшения количества криопротектора [2]. Также считалось, что оставшиеся эритроциты, разрушающиеся в процессе криоконсервации, снижают жизнеспособность ГСК/гемопоэтических прогениторных клеток (ГПК). Однако появившиеся недавно данные свидетельствуют, что удаление из ПК только плазмы значительно увеличивает общее количество ядросодержащих клеток (ЯК) в образце ПК до и после размораживания без серьезного влияния на качественные показатели [3]. На сегодняшний день достаточных данных о влиянии способа обработки (процессинг) ПК на количественные и качественные показатели ГСК ПК после разморажива-

ния нет, этот аспект оптимизации процедуры криоконсервации нуждается в дальнейшем изучении.

Выбор криопротектора

В 1959 г. в качестве криопротектора для ГСК был предложен и получил широкое распространение в протоколах криоконсервации диметилсульфоксид (ДМСО). В настоящее время различия в протоколах использования ДМСО как криопротектора представляют собой использование его в разных концентрациях с целью максимального снижения количества токсических эффектов и осмотического стресса.

Имеющиеся в настоящее время протоколы криоконсервации используют методы, установленные для прогениторных клеток КМ и периферической крови [4], которые зачастую разрабатывались эмпирически. Эти протоколы могут привести к потере до 50 % популяции ЯК, следовательно, такие потери для ПК неприемлемы. Исследованием влияния концентрации ДМСО, скорости его добавления и удаления было подтверждено заключение об оптимальной для ПК концентрации ДМСО — 10 % [4].

Способность ДМСО вызывать токсические эффекты известна. Исследования на животных показали дозозависимое сосудосуживающее действие ДМСО. Также описаны токсические явления при использовании ДМСО у людей. Данные явления развиваются во время реинфузии криоконсервированных клеток [5].

Традиционно в трансплантации стволовых клеток применяется стандартная концентрация ДМСО — 10 %. Однако было высказано предположение, что целесообразным может быть и снижение его концентрации. Более низкие концентрации ДМСО, например 5 и 3,5 %, также являются эффективными криопротекторами. Отмывка СК для удаления ДМСО, судя по всему, не оказывает неблагоприятного действия на гематологическое восстановление и может сократить токсические эффекты;

дробное применение СК также может сократить риск побочных эффектов. Согласно недавно полученным данным, минимальная итоговая частота токсических эффектов ДМСО, т. е. общее количество побочных эффектов, разделенное на общее количество трансплантаций, составляет 1,4 %.

Скорость, температура и протоколы замораживания и размораживания

Одним из первых получивших широкое распространение протоколов криоконсервации и размораживания ПК стал метод Нью-Йоркского центра крови [2], в котором образцы ПК после добавления 10 % ДМСО пассивно охлаждались до -50°C , а затем помещались в жидкую фракцию азота для хранения. Размораживание проводилось в водяной бане при температуре 37°C , затем клетки отмывались в растворе 2,5 % человеческого альбумина и 5 % декстрана, центрифугировались и ресуспендировались.

С развитием оборудования для замораживания и появлением замораживателей с программируемой скоростью протоколы замораживания также претерпели изменения. Появилась возможность составлять программы замораживания, примером может служить протокол Университета Миннесоты [6]. В ряде исследований была показана эффективность такого программируемого замораживания. Например, в исследовании Meyer T. P. et al. после криоконсервации на программном замораживателе наблюдались высокая жизнеспособность (89 %) и увеличение количества клеток CD34^+ (89 %) и КОЕ (88 %). В исследовании, посвященном эффекту криоконсервации на прогениторные клетки ПК (Shlebak A. et al.), криоконсервация, как после программируемого замораживания, так и после пассивного замораживания, незначительно сокращала количество мононуклеарных клеток (МНК), жизнеспособность и выживание КОЕ-ГМ, а также значительно сокращался потенциал КОЕ-ГМ продуцировать вторичные колонии ($p = 0,04$) [7].

Температура длительного хранения

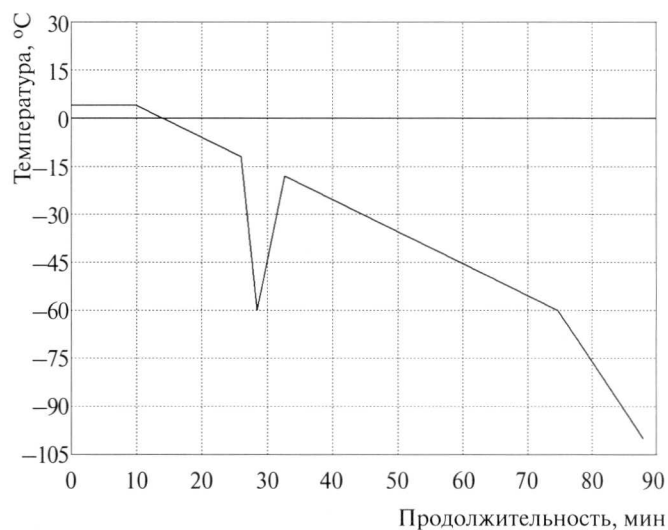
Около 10 лет назад стали появляться работы по оценке влияния на стволовые клетки длительного хранения в замороженном виде. Так, исследование длительного криохранения стволовых клеток КМ и периферической крови показало, что ГСК остаются пригодными для трансплантации после 14 лет криохранения. В конце прошлого века оценка количества КОЕ-ГМ, БФЕ-Э и КОЕ-ГЭММ в ПК после 12 лет хранения, а также построенная линейная модель (логарифм результатов жизнеспособности клеток) показали, что ПК может храниться длительное время без существенной потери ГСК. Путем исследований пролиферативной способности и способности к самовоспроизводству ГСК, выделенных из размороженных образцов ПК, было продемонстрировано отсутствие отрицательного эффекта от длительного криохранения (в течение 15 лет [8], а по последним данным — в течение 23,5 лет [9]) на количественные и качественные показатели ГСК. Сейчас уже имеются данные о клиническом применении ПК после длительного криохранения, которые свидетельствуют, что применение «старых», т. е. хранившихся 8 и более лет, образцов ПК не снижает итоговую выживаемость после трансплантации ПК (по сравнению

со «свежими» образцами) и что длительность криохранения не связана с ухудшением показателей трансплантации.

В нашей работе мы суммируем опыт Покровского банка стволовых клеток и научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий СЗГМУ им. И. И. Мечникова по криоконсервации ГСК из ПК, размораживанию и отмывке клеток от ДМСО различными способами для того, чтобы разработать оптимальные для наших условий протоколы криоконсервации и подготовки ГСК ПК к трансплантации (рисунок).

Для исследования были взяты 85 образцов концентрата лейкоцитарной фракции ПК, помещенных на криохранение в Общественный регистр доноров ПК в период с октября 2009 г. по ноябрь 2010 г. (медиана срока криохранения — 7 месяцев, размах — 2–15 месяцев). Перед замораживанием выделение лейкоцитарной фракции проводилось на аппарате Sepax S100 (Biosafe, Швейцария) (группа I; $n = 30$) и методом двойного центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Rotanta 460 RS (Hettich, Германия) (группа II; $n = 55$). Криопакет (Pall, США) с концентратом и криопротектором (раствор ДМСО — 10 %), упакованный в термоусадочный пакет (Thermogenesis, США), замораживался. Замораживание концентрата осуществлялось в программируемом замораживателе Cryo 560-16 (Planeg, Великобритания) по следующей схеме (Hubel A. et al., 2003 [6], в модификации Покровского банка стволовых клеток (Патент № 416197. Приоритет изобретения от 11 декабря 2009 г.)):

- стартовая температура -4°C удерживается в течение 10 мин;
- далее образец охлаждается со скоростью $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -12°C ;
- затем со скоростью $-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ охлаждается до -60°C ;
- далее образец нагревается со скоростью $15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -18°C ;
- затем снова охлаждается со скоростью $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -60°C ;
- на заключительной стадии образец охлаждается со скоростью $-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -100°C .



Кривая замораживания концентрата пуповинной крови для общественного регистра доноров

После размораживания все образцы обрабатывали (отмывали от криопротектора 10 %-м раствором ДМСО (Pall, Великобритания)) и проводили исследование качественных показателей.

Во всех образцах определялись количество ядерных клеток, абсолютное количество CD34⁺/CD45⁺ клеток и жизнеспособность в концентрате лейкоцитарной фракции до замораживания, после размораживания и отмывки клеток от криопротектора. Также определялись показатели выхода (recovery) CD34⁺/CD45⁺ клеток, ядродержащих клеток и жизнеспособности по формуле

$$\frac{Y_{at}}{Y_{pf}} 100,$$

где Y_{at} — показатель после размораживания и отмывки;

Y_{pf} — показатель до замораживания.

После размораживания и отмывки от криопротектора концентрата лейкоцитарной взвеси проводился подсчет количества ядерных клеток при помощи гематологического анализатора Coulter AcT diff 2 (Beckman Coulter, США), а также количества и жизнеспособности CD34⁺/CD45⁺ клеток на проточном цитометре Cytomix FC500 (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка данных осуществлялась по параметрическим статистическим методикам. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета прикладных программ Microsoft

Office Excel 2003 для Windows 2003 версия 1.0, IBM® SPSS® Statistics версия 19.0.

Результаты

Исходными данными служили показатели концентрата ПК, полученного в результате выделения ГСК/ГПК способами автоматической сепарации (группа I) и двойного центрифугирования (группа II). Полученные значения для общего количества ЯК, выхода ЯК, количества и жизнеспособности CD34⁺/CD45⁺ клеток до замораживания представлены в табл. 1 ($p = 0,01$). Данные изменения показателей концентрата пуповинной крови после размораживания при выделении стволовых клеток различными способами приведены в табл. 2.

Полученные авторами данные соответствуют данным литературных источников и показывают, что по общепринятым показателям качества ПК метод автоматической сепарации эффективнее стандартной методики двойного центрифугирования. Кроме того, показатели размороженного концентрата, в частности выход общего количества ЯК и клеток CD34⁺/CD45⁺, их жизнеспособность, также соответствуют данным литературы и свидетельствуют о том, что способ криоконсервации, используемый в Покровском банке стволовых клеток и научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий СЗГМУ им. И. И. Мечникова, позволяет эффективно хранить ГСК/ГПК пуповинной крови в течение длительного времени без потери качественных характеристик.

Таблица 1

Показатели концентрата пуповинной крови при выделении стволовых клеток различными способами

Технология выделения (метод размораживания)	Общее количество ядродержащих клеток	Выход ядродержащих клеток, %	Количество CD34 ⁺ /CD45 ⁺ клеток до замораживания	Жизнеспособность клеток до замораживания, %
I группа: клеточный сепаратор Serax S100 (Biosafe) Kit-530	$(1037,74 \pm 87,79) \cdot 10^6$	$81,1 \pm 0,85$	$(3,83 \pm 0,93) \cdot 10^6$	$98,48 \pm 0,37$
II группа: центрифуга Rotanta 460 RS (Hettich)	$(1119,65 \pm 55,70) \cdot 10^6$	$78,7 \pm 1,13$	$(3,54 \pm 0,30) \cdot 10^6$	$95,56 \pm 0,92$

Таблица 2

Изменение показателей концентрата пуповинной крови после размораживания при выделении стволовых клеток различными способами

Технология выделения (метод размораживания)	Общее количество ядродержащих клеток после размораживания	Выход ядродержащих клеток после размораживания, %	Количество CD34 ⁺ /CD45 ⁺ клеток после размораживания	Выход CD34 ⁺ /CD45 ⁺ клеток после размораживания, %	Жизнеспособность клеток после размораживания, %	Выход жизнеспособных клеток после размораживания, %
I группа: клеточный сепаратор Serax S100 (Biosafe) Kit-530	$(998,31 \pm 81,49) \cdot 10^6$	$97,38 \pm 2,11$	$(3,49 \pm 0,87) \cdot 10^6$	$89,85 \pm 1,28$	$88,13 \pm 1,16$	$89,48 \pm 1,09$
II группа: центрифуга Rotanta 460 RS (Hettich)	$(941,32 \pm 48,77) \cdot 10^6$	$84,55 \pm 1,53$	$(2,99 \pm 0,25) \cdot 10^6$	$85,71 \pm 1,67$	$78,90 \pm 1,87$	$83,07 \pm 2,18$

Обсуждение

Сегодня криоконсервация ядросодержащих клеток ПК признается одним из наиболее значимо влияющих на качественные показатели этапов обработки ПК. Успешное приживание при трансплантации ПК в значительной степени зависит от общего количества ЯК в образце после размораживания. В связи с этим для повышения эффективности трансплантаций ПК необходима, кроме сбора адекватного количества гемопоэтических прогениторных клеток, последующая успешная криоконсервация этих клеток без серьезных потерь жизнеспособности и количества. Исходя из этого критерии криоконсервации, разработанные для СК КМ и периферической крови, для ПК неприменимы. В первую очередь это связано с большой разницей в количестве клеток между трансплантатом КМ, при котором потеря до 50 % стволовых клеток не является критичной, и ПК, где потеря даже 10 % может оказаться фатальной.

Сейчас все больше говорится о том, что одним из способов улучшения исходов трансплантации ПК, наряду с новыми протоколами применения ПК, является улучшение качества образцов ПК, помещаемых для длительного криохранения в общественные банки ПК. В этом случае этапы банкирования ПК, особенно такие критичные, как криохранение и подготовка к трансплантации, требуют особенного внимания.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что протокол криоконсервации, используемый в научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий СЗГМУ им. И. И. Мечникова, а также метод замораживания с использованием программируемого замораживателя являются полностью пригодными для обеспечения сохранности качественных показателей концентрата ЯК ПК (количества клеток CD34⁺/CD45⁺, показателей жизнеспособности). При наличии соответствующего технического оснащения наиболее эффективным методом обработки ПК как для выделения концентрата ЯК, так и для последующей его отмывки после

размораживания является автоматический метод. В частности, может применяться система клеточной сепарации Sepax S100 (Biosafe, Швейцария).

Список литературы

1. *Gluckman E., Broxmeyer H. E., Auerbach A. D. et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling // *N Engl J Med.* 1989. № 321 (17).
2. *Rubinstein P. et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. № 92 (22).
3. *Chow R. et al.* Cell recovery comparison between plasma-depletion/reduction- and red cell reduction processing of umbilical cord blood // *Cytotherapy.* 2011. № 13 (9).
4. *Hunt C. J., Armitage S. E., Pegg D. E.* Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // *Cryobiology.* 2003. № 46 (1).
5. *Zenhausern R., Tobler A., Leoncini L. et al.* Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary cardiac amyloidosis and end-stage renal failure // *Ann Hematol.* 2000. № 79 (9).
6. *Hubel A. et al.* Cryopreservation of cord blood after liquid storage // *Cytotherapy.* 2003. № 5 (5).
7. *Shlebak A. A. et al.* Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation // *Bone Marrow Transplantation.* 1999. № 23 (2).
8. *Broxmeyer H. E.* High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. № 100 (2).
9. *Broxmeyer H. E.* Experimental basis of cord blood transplantation // *Bone Marrow Transplantation.* 2009. № 44 (10).