



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.8.4.006>
УДК 616.15-018:618.48]-026.656



Новикова М.А., Исайкина Я.И., Фролова Р.Л., Савич Ю.В., Лях Е.Г.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Содержание и функциональная активность гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови после криохранения

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Новикова М.А. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Исайкина Я.И. – концепция и дизайн исследования, утверждение окончательного варианта статьи; Фролова Р.Л. – редактирование, Савич Ю.В. – сбор и обработка материала, Лях Е.Г. – сбор и обработка материала.

Подана: 15.08.2022

Принята: 29.09.2022

Контакты: yaninai@mail.ru

Резюме

Введение. Пуповинная кровь (ПК) является важным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для пациентов, имеющих широкий спектр онкологических и гематологических заболеваний. Успешное приживление трансплантата пуповинной крови зависит от сбора адекватного количества гемопоэтических клеток с последующей их криоконсервацией без серьезных потерь в количестве и жизнеспособности. **Цель.** Оценка влияния процессов криозамораживания/оттаивания и хранения при сверхнизкой температуре на содержание и функциональную активность ГСК в образцах ПК.

Материалы и методы. Криозамораживание образцов ПК проводили с использованием программируемого замораживателя с добавлением криопротектора с последующим хранением в специализированном криохранилище. Подсчет количества и жизнеспособности ядросодержащих клеток (ЯСК) осуществляли до криозамораживания и после оттаивания. Функциональную активность оценивали по колониеобразующей способности ГСК в среде метилцеллюлозы с добавлением рекомбинантных ростовых факторов.

Результаты. Нами не выявлено достоверной разницы в содержании ЯСК до замораживания – $9,9 \times 10^6$ (8,25; 12,23) $\times 10^6$ и после размораживания – $8,66 \times 10^6$ (6,85; 10,79) $\times 10^6$ образцов ПК ($p=0,0859$). Наблюдалось достоверное снижение жизнеспособности клеток ПК после оттаивания в среднем на 10% ($p=0,0001$) и после отмывки от криоконсерванта в среднем на 17% ($p=0,0001$). Было показано отсутствие достоверной разницы в абсолютном количестве колониеобразующих единиц (КОЕ) до и после криозамораживания/оттаивания ($p<0,05$).

Выводы. Процессы криозамораживания/оттаивания и хранения при сверхнизкой температуре не приводят к значительной потере ЯСК в образцах пуповинной крови, но достоверно снижают показатели жизнеспособности. ГСК ПК сохраняют функциональную активность и их пролиферативный потенциал после оттаивания.

Ключевые слова: пуповинная кровь, гемопозитические стволовые клетки, криозамораживание, жизнеспособность, колониеобразующая способность

Novikova M., Isaikina Ya., Fralova R., Savich Yu., Liakh E.
Belarusian Research Centre for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

The Amount and Functional Activity of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Novikova M. – concept and design of scientific research, analysis and interpretation of results, article writing; Isaikina Ya. – concept and design of scientific research, final approval of the article; Fralova R. – article edition, Savich Yu. – data collection and analysis, Liakh E. – data collection and analysis.

Submitted: 15.08.2022

Accepted: 29.09.2022

Contacts: yaninai@mail.ru

Abstract

Introduction. Umbilical cord blood (UCB) is a significant source of hematopoietic stem cells (HSC) for patients with of oncological and hematological diseases. Collection of an adequate number of hematopoietic cells and cryopreservation without serious losses in number and viability can significance for success engraftment of UCB transplant.

Purpose. Evaluation of freezing/thawing and storage at ultra-low temperature on the content and functional activity of HSCs in UCB units.

Materials and methods. UCB units was cryopreserved with freezing solution by programmer freezer. UCB samples were transferred to specialized cryostorage. The number and viability of nucleated cells (NCs) were counted before freezing and after thawing. Functional activity was assessed by the colony-forming ability of HSCs in methylcellulose medium, with recombinant growth factors.

Results. The significant difference in the content of NC in samples before freezing – $9,9 \times 10^6$ (8.25; 12.23) $\times 10^6$ and after thawing – $8,66 \times 10^6$ (6.85; 10.79) $\times 10^6$ ($p=0.0859$) have been not revealed. Research has been demonstrated a significant decrease in the viability of UCB cells after thawing by an average of 10% ($p=0.0001$) and after washing by an average of 17% ($p=0.0001$). No significant difference has been shown in the absolute number of colony forming units (CFU) before and after freezing/thawing ($p<0.05$).

Conclusions. The freezing/thawing and storage at ultra-low temperature maintain amount of NC in cord blood units, but significantly reduce viability. UCB HSCs retain functional activity and proliferative potential after thawing.

Keywords: cord blood, hematopoietic stem cells, cryopreservation, viability, colony-forming ability



■ ВВЕДЕНИЕ

Пуповинная кровь (ПК) является важным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для пациентов, имеющих широкий спектр онкологических и гематологических заболеваний, которые нуждаются в аллогенной трансплантации, но не имеют подходящего совместимого донора. Начало исследованиям, подтверждающим, что ПК может быть потенциальным источником пригодных для трансплантации ГСК, положила успешная трансплантация ПК, осуществленная 6 октября 1988 г. [1]. В настоящее время в мире ежегодно проводится более 2–3 тысяч трансплантаций ПК. Приживление трансплантата ПК в значительной степени зависит от качества сбора ПК, количества ядродержащих клеток (ЯСК) и ГСК в собранном материале и их последующей криоконсервации без серьезных потерь в жизнеспособности и числе [2, 3]. Однако в процессе замораживания и размораживания в клетках могут возникнуть различные морфофункциональные повреждения (нарушение целостности мембраны, изменение конформации макромолекул), что снижает общее количество жизнеспособных и функционально активных клеток. Глубина этих повреждений напрямую зависит от технологии замораживания/оттаивания клеточного материала [4–6].

Оптимальный метод сохранения и получения жизнеспособных ГСК зависит от ряда параметров, таких как время перевозки и температура хранения после сбора; способ обработки перед криохраниением; выбор криопротектора; скорость, температура и протоколы процедур замораживания и размораживания; температура при длительном хранении в криобанке [7, 8].

Рядом исследователей было показано, что образцы ПК могут храниться при комнатной температуре 22 ± 4 °C или при +4 °C в течение 24 часов, однако допускается хранение и до 48 часов без значительного снижения количественных и качественных показателей [9–12].

Имеющиеся данные о влиянии концентрации криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО), скорости его добавления к клеточному материалу и удаления при отмывке позволили сделать заключение, что и 2,5%, 5% и 7,5%-ный ДМСО может быть использован в качестве криопротектирующего раствора, но оптимальной для ПК является 10%-ная концентрация ДМСО [14].

В настоящее время для характеристики ГСК и клеток-предшественников используют иммунофенотипические маркеры, которые позволяют установить степень зрелости стволовых клеток, а также принадлежность клеток-предшественников к различным линиям. Однако иммунофенотип не всегда раскрывает функциональный потенциал ГСК. Поэтому для характеристики функциональной активности используют анализ способности стволовых клеток и клеток-предшественников к пролиферации и колониеобразованию [13, 15]. Полипотентные стволовые клетки дают начало более дифференцированным клеткам или колониеобразующим единицам (КОЕ), наиболее ранние из которых гранулоцитарно-эритроцитарно-миелоцитарно-макрофагальные (КОЕ-ГЭММ) дифференцируются в более зрелых 3 типа клеток: колониеобразующая единица гранулоцитов и моноцитов (КОЕ-ГМ), бурс-образующая единица эритроцитов (БОЕ-Э) и колониеобразующая единица мегакариоцитов (КОЕ-МГЦ), которые участвуют в формировании гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков кроветворения.

Ряд авторов при исследовании способности к пролиферации клеток-предшественников гемопоэза из размороженных образцов ПК продемонстрировали отсутствие отрицательного эффекта криозаморозки и длительного хранения в течение 23,5 года на количественные и качественные показатели ГСК [16, 17]. Результаты клинического применения образцов ПК, депонированных в криобанках, также показывают отсутствие ухудшения показателей приживления трансплантата, бессобытийной выживаемости, трансплантат-ассоциированной смертности и рецидива у пациентов, получивших трансплантат ГСК ПК после криохранения [2–5].

В разработанном нами протоколе криозамораживания ПК для приготовления криопротектирующего раствора используется 6%-ный раствор гидроксиэтилкрахмала.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка влияния процедуры криозамораживания с использованием нашего протокола на количество ЯСК и функциональную активность ГСК в образцах ПК, помещенных на длительное криохранение.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены образцы ПК, заготовленные для проведения контроля качества трансплантата ПК и помещенные на криохранение в период с января 2021 г. по апрель 2022 г. (медиана срока хранения – 6 месяцев) в объеме 1 мл.

Криопротектирующий раствор готовили из криопротектора ДМСО в 6%-ном гидроксиэтилкрахмале и добавляли к полученному образцу ПК в количестве, обеспечивающем 10%-ное содержание ДМСО в конечном продукте. Замораживали с использованием программируемого замораживателя IceCube 1810 (Sy-Lab, Австрия) и следующего протокола снижения температуры:

- температура в камере замораживателя 4 °C при загрузке материала;
- снижение температуры со скоростью –2 °C/мин до –10 °C;
- снижение температуры со скоростью –25 °C/мин до –50 °C;
- повышение температуры со скоростью 15 °C/мин до –20 °C;
- снижение температуры со скоростью –1 °C/мин до –90 °C.

Хранение образцов ПК осуществляли в специализированном криохранилище (Sy-Lab, Австрия) при сверхнизкой температуре –196 °C.

Размораживание образцов ПК проводилось непосредственно перед исследованием на водяной бане при температуре 37 °C при равномерном покачивании в течение 5 минут (до момента перехода замороженного материала в жидкую фазу). Подсчет ЯСК и ЖСП клеток производили дважды: непосредственно после размораживания и после процедуры отмывки, когда содержимое образцов переносили в холодную полную среду RPMI, содержащую 1% антибиотика-антимикотика и 10% ЭТС, центрифугировали при 400 g в течение 10 мин., клетки ресуспендировали в NaCl с 10% ЭТС и подсчитывали. Подсчет ЯСК осуществляли методом микроскопии клеток в камере Горяева. ЖСП клеток определяли добавлением к 20 мкл клеточной суспензии 20 мкл трипанового синего, инкубацией клеток с красителем в течение 5 мин. и последующим подсчетом количества живых клеток (не окрашенных) и мертвых (окрашенных) в гемоцитометре под световым микроскопом. Общее количество подсчитанных клеток – не менее 100.

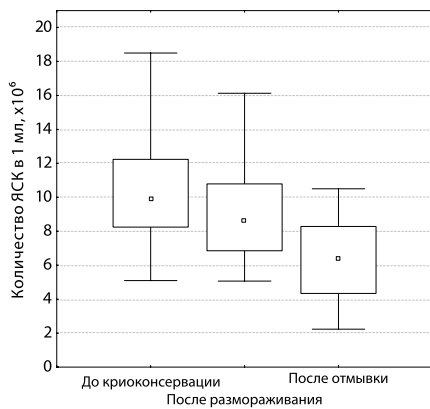


Колониеобразующую способность ГСК в образцах ПК определяли с помощью культивирования 1×10^5 клеток в среде метилцеллюлозы, содержащей рекомбинантные гемопоэтические ростовые факторы (StemCell Technologies, Канада) в течение 14 сут. при температуре 37 °C, 5% CO₂ и 90% влажности с подсчетом количества КОЕ-ГМ, БОЕ-Э, КОЕ-ГЭММ. Количество КОЕ подсчитывали под инвертированным микроскопом AXIOVERT (Zeiss, Германия).

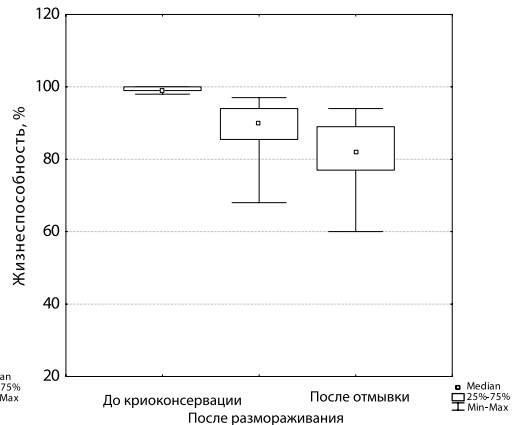
Статистическую обработку данных проводили с применением программы Statistica 7.0. Использовали методы описательной статистики и непараметрический метод – t-критерий Вилкоксона. Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего провели оценку качества 24 образцов ПК. Последовательное тестирование образцов ПК на различных этапах криохранения включено в международный стандарт сбора, обработки, криозамораживания и хранения ПК NetCord-FACT и определяет пригодность материала к дальнейшему практическому применению в зависимости от соответствия стандартам. Медиана содержания ЯСК в 1 мл в образцах ПК до криозамораживания составляла $9,9 \times 10^6$ (8,25; 12,23) $\times 10^6$, после размораживания – $8,66 \times 10^6$ (6,85; 10,79) $\times 10^6$, а после отмывки – $6,4 \times 10^6$ (4,34; 8,28) $\times 10^6$. Нами не выявлено достоверной разницы в содержании ЯСК до замораживания ПК и непосредственно после размораживания ($p=0,0859$), но достоверное снижение количества ЯСК наблюдалось после отмывки образцов от криопротектора ($p=0,00014$) (см. рисунок А). Выход ЯСК после криохранения составил 85,31% (72,96; 98,56)%.



А



В

Количество и жизнеспособность ядродержащих клеток пуповинной крови до криоконсервации, после размораживания и отмывки: А – число ЯСК, В – жизнеспособность ЯСК, * $p < 0,001$

Amount and viability of cord blood nuclear cells before cryopreservation, after thawing and washing: А – number of nuclear cells, В – viability of nuclear cells, * $p < 0,001$

Количество КОЕ клеток-предшественников гемопоэза в образцах ПК до и после криозамораживания (n=24)

Amount of CFU cord blood hematopoietic stem cells before cryopreservation and after thawing (n=24)

КОЕ	До замораживания	После оттаивания	p
КОЕ-ГМ	5,31 (2,01–15,71)	5,28 (1,72–27,94)	0,9405
БОЕ-Э	2,81 (0,51–8,88)	2,57 (0,58–12,96)	0,6813
КОЕ-ГЭММ	0,93 (0,18–2,24)	0,78 (0–3,51)	0,2322

Наблюдалось достоверное снижение ЖСП клеток как сразу после разморозки образцов ПК, так и после их отмывки ($p=0,0001$) (см. рисунок В). Медиана ЖСП до и после криозамораживания имела значения 99% (99; 100)% и 90% (85,5; 94)% соответственно, а после отмывки – 82% (77; 89)%. Процесс криоконсервирования и хранения при сверхнизкой температуре приводит к снижению жизнеспособности клеток ПК после оттаивания на 10%, а проведение дальнейшей отмывки от криопротектора – на 17%. Исходя из полученных данных, можно предположить, что потеря в содержании ЯСК и их жизнеспособности после размораживания образцов ПК обусловлена в большей степени отмывкой материала от криоконсерванта, что необходимо учитывать при дальнейшем использовании в качестве трансплантата при расчете клеточных доз.

Колониеобразующая способность ГСК является достоверным показателем их пролиферативного потенциала и функциональной способности восстанавливать гемопоэз после трансплантации. Было показано отсутствие достоверной разницы в абсолютном количестве КОЕ-ГМ, БОЕ-Э и КОЕ-ГЭММ до и после криозамораживания/оттаивания ($p<0,05$) (см. таблицу).

Процент сохранения КОЕ-ГМ и БОЕ-Э после размораживания образцов ПК составил 95,6% и 96% соответственно. Полученные нами результаты сопоставимы с данными исследований зарубежных ученых. Miura J. et al. исследовали 54 образца ПК, подвергшихся криозамораживанию, процент сохранения ЯСК и КОЕ-ГМ в которых составил $96,0\pm11,3\%$ и $88,6\pm41,2\%$ соответственно [18]. В исследовании Zinno F. et al. процент сохранения ЯСК в 40 образцах ПК после криохранения составил $78,9\pm15,4\%$, из них $85,5\pm10,6\%$ жизнеспособных клеток [19]. Таким образом, анализ способности к колониеобразованию клеток-предшественников гемопоэза в образцах ПК после криохранения подтвердил, что пролиферативная активность ГСК пуповинной крови при использовании нашего протокола замораживания с использованием ДМСО в 6%-ном гидроксиэтилкрахмале остается на высоком уровне.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применяемый нами протокол обработки пуповинной крови перед замораживанием с использованием криопротектирующего раствора ДМСО в 6%-ном гидроксиэтилкрахмале и протокол замораживания образцов в программируемом замораживателе не приводят к потере ядросодержащих клеток в образцах ПК и сохраняют функциональную активность гемопозитических клеток-предшественников на высоком уровне. Использование размороженного образца ПК для трансплантации пациенту без предварительной отмывки клеток позволит сохранить их жизнеспособность.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. et al. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, vol. 321, no 17, pp. 1174–1178.
2. Gluckman E., Rocha V. (2004) Cord blood transplantation for children with acute leukaemia: a Eurocord registry analysis. *Blood cells, molecules, and diseases*, vol. 33, no 3, pp. 271–273.
3. Wagner J.E., Barker J.N., DeFor T.E. et al. (2002) Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, vol. 100, no 5, pp. 1611–1616.
4. Milano F., Gooley T., Wood B., et al. (2016) Cord-blood transplantation in patients with minimal residual disease. *N Engl J Med*, vol. 375, pp. 944–953.
5. Anand S., Thomas S., Corbet K., et al. (2017) Adult umbilical cord blood transplantation using myeloablative thiotepa, total body irradiation, and fludarabine conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 23, no 11, pp. 1949–1954.
6. van Rood J.J., Scaradavou A., Stevens C.E., (2012) Indirect evidence that maternal microchimerism in cord blood mediates a graft-versusleukemia effect in cord blood transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 109, no 7, pp. 2509–2514.
7. Jaime-Perez J.C., Monreal-Robles R., Rodriguez-Romo L.N., et al. (2011) Evaluation of volume and total nucleated cell count as cord blood selection parameters: a receiver operating characteristic curve modeling approach. *Am J Clin Pathol*, vol. 136, no 5, pp. 721–726.
8. Page K.M., Mendizabal A., Betz-Stablein B., et al. (2014) Optimizing donor selection for public cord blood banking: influence of maternal, infant, and collection characteristics on cord blood unit quality. *Transfusion*, vol. 54, no 2, pp. 340–352.
9. Hubel A., Carlquist D., Clay M., et al. (2003) Cryopreservation of cord blood after liquid storage. *Cytotherapy*, vol. 5, no 5, pp. 370–376.
10. Radke T.F., Barbosa D., Duggeby R.C. et al. (2013) The assessment of parameters affecting the quality of cord blood by the appliance of the Annexin V staining method and correlation with CFU assays. *Stem Cells Int*, article number 823912, <https://doi.org/10.1155/2013/823912>
11. Tsagias N., Kouzi-Koliakos K., Karagiannis D.H., et al. (2007) Time and temperature before processing influence the recovery of umbilical cord blood hematopoietic progenitors. *Transfusion*, vol. 47, pp. 1550–1552.
12. NetCord-FACT (2019) International standards for cord blood collection, banking, and release for administration, 7th ed Omaha, NE (US) Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy. Available at: <https://www.factweb.org>
13. Meyer T.P., Hofmann B., Zaisserer J., et al. (2006) Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Cytotherapy*, vol. 8, no 3, pp. 265–276.
14. Fry L.J., Querol S., Gomez S.G., et al. (2015) Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang*, vol. 109, no 2, pp. 181–90.
15. Zbigniew R.M., Adla A., Julio L. (2012). Transient warming events and cryogenic storage of cord blood mononuclear cells for stem cell transplantation. *J Transf Med*, vol. 5, no 4, pp. 153–158.
16. Pasha R., Howell A., Turner TR et al. (2020) Transient warming affects potency of cryopreserved cord blood units. *Cytotherapy*, vol. 22, no 11, pp. 690–697.
17. Pasha R., Elmoazzen H., Pineault N. (2017) Development and testing of a stepwise thaw and dilute protocol for cryopreserved umbilical cord blood units. *Transfusion*, vol. 57, no 7, pp. 1744–1754.
18. Miura J., Minegishi M., Itoh T. et al. (2008) Quality evaluation of umbilical cord blood progenitor cells cryopreserved with a smallscale automated liquid nitrogen system. *Cryobiology*, vol. 57, no 2, pp. 178–181.
19. Zinno F., Landi F., Aureli V. et al. (2010) Pre-transplant manipulation processing of umbilical cord blood units: Efficacy of Rubinstein's thawing technique used in 40 transplantation procedures. *Transfus Apher Sci*, vol. 43, no 2, pp. 173–178.