

Литература

1. Михайлов В.М. Вариабельность ритма сердца. Опыт практического применения метода / В.М.Михайлов // Иваново. – 2002.
2. Писарук А.В. Вариабельность ритма сердца при старении / А.В.Писарук // Нарушения ритма сердца: возрастные аспекты. Матер. I Укр. науч.-практ. конф. с международным участием. Киев, 19-20 октября 2000 г. – К., 2000. – С. 176-182.
3. Сурков К.Г. Доклинические исследования отечественного препарата стволовых клеток пуповинной крови «Криоцел» / К.Г.Сурков, Л.А.Белова, В.К.Красняков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – № 1 (3). – 2006. – С. 74-76.
4. Швалев В.Н. Феномен ранней возрастной инволюции симпатического отдела вегетативной нервной системы / В.Н.Швалев, Н.А.Тарский // Кардіологія. – 2001. – № 2. – С. 10-14.

ДЛЯ ПРЕПАРАТУ СТОВБУРОВИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ВЕГЕТАТИВНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ У СТАРИХ ЩУРІВ

Л.О.Бабійчук, В.І.Грищенко, Л.В.Бабійчук

Резюме. Встановлено, що гемопоетичні стовбурові клітини кордової крові здатні значно підвищувати адаптаційні можливості людей літнього віку. Підтвердженням цього є дані спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму (ВСР), які свідчать про підйом загальної спектральної потужності не лише за рахунок активації гуморальної складової регуляції, а й завдяки підвищенню активності всіх складових регуляції.

Ключові слова: варіабельність серцевого ритму, вегетативна нервова система, стовбурові гемопоетичні клітини.

THE EFFECT OF A PREPARATION OF HUMAN CORD BLOOD HEMOPOIETIC STEM CELLS ON SOME INDICES OF VEGETATIVE REGULATION IN AGED RATS

L.A.Babiuchuk, V.I.Grishchenko, L.V.Babiuchuk

Abstract. It has been established that hemopoietic stem cells of cord blood are capable of a significant increase of adaptation possibilities of an aged organism. A confirmation of this is the data of a spectral analysis of the variability of the cardiac rhythm (VCR), testifying to a rise of total spectral power not only due to the activation of the humoral components of regulation, but due to an increase in the activity of all the regulation links.

Key words: variability of cardiac rhythm, vegetative nervous system, hemopoietic stem cells.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkov)

Рецензент – доц. Р.С.Булик

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol. 13, № 4. – P.20-23

Надійшла до редакції 17.08.2009 року

© Л.А.Бабійчук, В.І.Грищенко, Л.В.Бабійчук, 2009

УДК 611.018.5.013.8:615.014.41:547.42

Л.А.Бабійчук, П.М.Зубов, В.В.Рязанцев, О.Л.Зубова, О.В.Кудокоцева, Т.М.Гурина

КОРДОВАЯ КРОВЬ – АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ИСТОЧНИК СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ: НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОБЛЕМЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Отдел криоцитологии и количественной морфологии (руковод. – проф. Л.А.Бабійчук)
Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Резюме. Разработаны новые эффективные методы выделения и криоконсервирования ядродержащих (CD45⁺), в том числе стволовых (CD34⁺) клеток кордовой крови человека. Оценка структурно-функциональной полноценности и жизнеспособности разных популяций ядродержащих клеток кордовой крови свидетельствует, что данные методы позволяют сохранять до 85 % CD45⁺- клеток и до 98 % CD34⁺- клеток в жизнеспособном состоянии после криоконсервирования. При

этом основные потери CD45⁺- клеток происходят за счет фракции гранулоцитов, а лимфоциты и моноциты сохраняются практически полностью. При анализе изменений липидной асимметрии мембран с помощью аннексинаV обнаружена аналогичная зависимость в дестабилизации клеток.

Ключевые слова: кордовая кровь, стволовые клетки, криоконсервирование, жизнеспособность, липидная асимметрия.

© Л.А.Бабійчук, П.М.Зубов, В.В.Рязанцев, О.Л.Зубова, О.В.Кудокоцева, Т.М.Гурина, 2009

Введение. Процесс старения приводит к неуклонному регрессу практически всех функциональных систем организма. Это значительно ограничивает его способность адаптироваться к изменениям, компенсировать нарушенные функции, может приводить к выходу жизненно важных показателей за пределы, обеспечивающие сохранение постоянства внутренней среды организма, и возникновению патологии. Совершенно ясно, что наблюдаемая в старости повышенная частота различных патологических процессов является следствием неблагоприятных влияний, действующих на организм в течение жизни. Основу повышенной заболеваемости людей старшего возраста необходимо искать в возрастных изменениях клеток, систем и органов. С возрастом регенерация клеток снижается и организм не успевает полностью обновляться, а постоянная борьба с болезнями и внешними факторами еще больше ускоряет изнашивание и увядание организма.

Одним из наиболее перспективных источников получения стволовых клеток является кордовая/пуповинная кровь. Все чаще кордовая кровь (КК) используется как альтернативный костному мозгу источник гемопоэтических стволовых клеток. Кордовая кровь содержит большую часть некоммутированных гемопоэтических клеток, чем взрослый костный мозг. Более того, гемопоэтические стволовые клетки из кордовой крови обладают большим потенциалом пролиферации и экспансии, чем их аналоги из взрослого костного мозга [1].

Помимо этого, в последнее время была показана плюрипотентность и высокая пластичность ГСК КК, что позволило рассматривать их как потенциальный источник для клеточной терапии более широкого спектра заболеваний. В последние годы, кроме гемопоэтических стволовых CD34⁺ клеток, в КК были описаны мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, CD133⁺ популяция, которая имеет больший пролиферативный потенциал и является более ранними гемопоэтическими предшественниками, чем CD34⁺ [3].

Высокая востребованность в препаратах КК, как источника стволовых клеток, приводит к необходимости создания банков КК, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии при температуре жидкого азота (-196⁰C) в течение длительного времени, без потери их биологических свойств.

Цель исследования. Комплексно оценить структурно-функциональное состояние клеток на каждом этапе криоконсервирования (выделение, обработка криопротектором и после замораживания-отогрева), что позволит объективно определить уровень сохранности и жизнеспособности клеток в зависимости от повреждающего фактора.

Материал и методы. Сбор КК производили после получения письменного информированного согласия у беременной. Выделение фракции ЯСК из КК проводили методом седиментации в 6 % растворе декстрана с молекулярной массой 60000 (полиглюкин). В качестве криопротектора

использовали криопротектор ДМСО в конечной концентрации 5 %, приготовленный на растворе полиглюкина. Добавление ДМСО проводили на ледяной бане во избежание гипертермии клеток. Криоконсервирование клеток проводили в замораживателе фирмы Cryosap по специально разработанной нами четырехэтапной программе.

Фенотипирование ядросодержащих клеток (ЯСК) (CD45⁺) кордовой крови, в том числе и гемопоэтических (CD34⁺) до и после криоконсервирования проводилось методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» фирмы «Becton Dickinson» (США) с использованием реагентов BD по международному ISHAGE протоколу. Жизнеспособность ЯСК, а также нарушение асимметричного распределения фосфатидилсерина в мембране оценивали методом проточной цитофлуориметрии, используя ДНК краситель 7AAD и аннексин V (BD) соответственно.

Анализ сохранности ЯСК, выделенных с применением полиглюкина в соотношении с КК 1:1 показал, что данный метод позволяет выделить до 80% ЯСК (CD45⁺-клеток) из КК и до 90 % гемопоэтических стволовых (CD34⁺-клеток) и не приводит к снижению их жизнеспособности.

Предлагаемый нами безотмывочный метод криоконсервирования ЯСК КК заключается в предварительном концентрировании методом двухэтапного центрифугирования клеточной суспензии в объеме не более 10 мл и медленном добавлении на холоду раствора ДМСО. Разработанная нами четырехэтапная программа замораживания в сочетании с предлагаемым методом предобработки суспензии клеток позволяет снизить концентрацию ДМСО до 5 % и получить после размораживания высокий процент сохраненных клеток (до 85 % CD45⁺-клеток и до 95 % CD34⁺-клеток). При этом жизнеспособность CD45⁺ клеток, выделенных и криоконсервированных нашим методом, была до 85 %, а жизнеспособность CD34⁺-клеток составляла до 98 % (рис. 1).

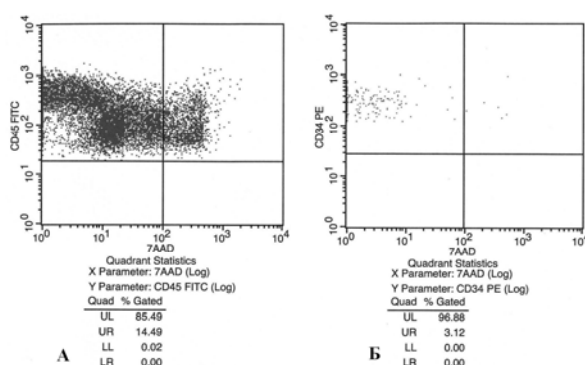


Рис. 1. Жизнеспособность ядросодержащих (CD45⁺) (А) и стволовых (CD34⁺) (Б) клеток кордовой крови

Результаты исследования и их обсуждение.

Анализ перераспределения популяционного состава CD45-клеток до и после криоконсервирования показал, что потери клеток при замораживании происходят в основном за счет гранулоцитов,

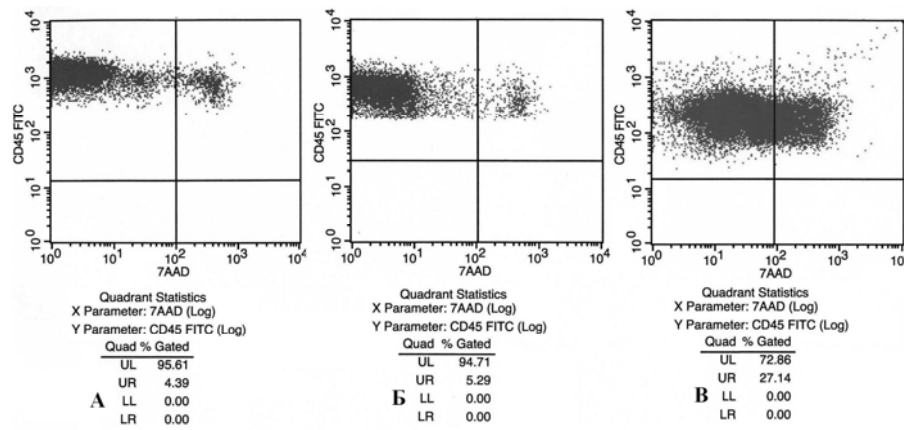


Рис. 2. Жизнеспособность фракций CD45-клеток после криоконсервирования. А – лимфоциты, Б – моноциты, В – гранулоциты

Таблица

Процент аннексинV⁺ клеток до и после криоконсервирования (n=11)

Группа	Контрольная группа	Выделенные ЯСК и обработанные ДМСО	После криоконсервирования
Лимфоциты	0	0,20±0,05	0,37±0,19
Моноциты	1,28±0,10	1,86±0,73	6,7±1,62
Гранулоциты	2,64±0,7	4,55±1,28	15,68±2,42

а относительное содержание лимфоцитов и моноцитов увеличивается (рис. 1). При пересчете на абсолютное количество клеток в контроле потери гранулоцитов составляют 30 %, моноцитов – до 4 %, а лимфоцитов – до 2 %. Также была проанализирована жизнеспособность различных популяций ЯСК после криоконсервирования (рис. 2).

Видно, что снижение жизнеспособности общей популяции CD45⁺-клеток тоже происходит в основном за счет гранулоцитов, жизнеспособность которых составляет 69,8±3,7 %. Жизнеспособность мононуклеаров составляла 94-98 %.

Под действием различных факторов криоконсервирования может происходить нарушение структурно-функциональных свойств мембран и, прежде всего, изменение трансбислойного распределения липидов в мембране, что, в конечном счете, отразится на состоянии клеток после размораживания. Известно, что переход фосфатидилсерина (ФС) во внешний монослой мембраны (в норме расположен только на внутренней стороне), служит маркером апоптоза и сигнальным рецептором утилизации данных клеток макрофагами реципиента. То есть ЯСК, несущие на своей поверхности ФС, будут подвергаться активной элиминации макрофагами, что повлечет за собой низкую эффективность трансплантата.

Проведенные нами исследования ЯСК КК методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексинаV – белка, который имеет высокое сродство к ФС и связывается с клетками, экспрессирующими его только на наружной поверхности мембраны, показали, что в нативной

крови процент аннексинV⁺ – клеток составил 1,86±0,24 %. Выделение и обработка криопротектором не приводят к достоверным изменениям данного показателя. После криоконсервирования ЯСК разработанным нами методом нарушение асимметрии было в среднем 6,34±1,02 %, что свидетельствует о сохранении структурной полноценности клеток. Анализ изменений липидной асимметрии в популяциях ЯСК, полученных и криоконсервированных нашим методом показал, что под действием факторов криоконсервирования, минимальные изменения наблюдаются у фракции мононуклеаров (лимфоциты, моноциты) и максимальны у гранулоцитов (табл.), что коррелирует с полученными нами данными по жизнеспособности клеток.

Выводы

1. Разработанный метод позволяет снизить эффективную концентрацию ДМСО до 5 % и минимизировать негативное влияние физико-химических факторов криоконсервирования, сохраняя до 85 % CD45⁺- клеток и до 98 % CD34⁺-клеток в жизнеспособном состоянии. При этом, основные потери CD45⁺- клеток происходит за счет фракции гранулоцитов, а лимфоциты и моноциты сохраняются практически полностью.

2. Анализ изменений липидной асимметрии мембран с помощью аннексинаV (маркера первой стадии апоптоза) свидетельствует, что под действием факторов криоконсервирования, минимальные изменения наблюдаются у фракции мононуклеаров (лимфоциты, моноциты) и макси-

мальны у гранулоцитов, что коррелирует с полученными нами данными по жизнеспособности клеток.

Литература

1. Абдулкадыров К. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопотенциального потенциала / К.Абдулкадыров, Н.Романенко // Трансфузиология. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 15-33.
2. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками / [Е.Б.Владимирская, О.А.Майорова, С.А.Румянцев, А.Г.Румянцева]. – М.: Медпрактика, 2005. – 391 с.
3. Bieback K. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood / K.Bieback, S.Kern, H.Kluter // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22. – P. 625-634.
4. Kakinuma S. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells / S.Kakinuma, Y.Tanaka, R.Chinzei // Stem Cells. – 2003. – Vol. 21, № 2. – P. 217-227.
5. Sanchez-Ramos J. Expression of neural markers in human umbilical cord blood / J.Sanchez-Ramos, S.Song, S.Kamath // Exp. Neurol. – 2001. – Vol. 171. – P. 109-115.

КОРДОВА КРОВ – АЛЬТЕРНАТИВНЕ ДЖЕРЕЛО СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ: НОВІ ПІДХОДИ ДО ПРОБЛЕМИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Л.О.Бабійчук, П.М.Зубов, В.В.Рязанцев, О.Л.Зубова, О.В.Кудокотсева, Т.М.Гуріна

Резюме. Розроблені нові ефективні методи виділення та кріоконсервування ядровмісних (CD45⁺), у тому числі стовбурових (CD34⁺) клітин кордової крові людини. Оцінка структурно-функціональної повноцінності та життєздатності різних популяцій ядровмісних клітин кордової крові свідчить, що ці методи дозволяють зберігати до 85 % CD45⁺- клітин і до 98 % CD34⁺- клітин в життєздатному стані після кріоконсервування. При цьому основні втрати CD45⁺- клітин відбуваються за рахунок фракції гранулоцитів, а лімфоцити і моноцити зберігаються практично повністю. При аналізі змін ліпідної асиметрії мембран за допомогою анексину V спостерігається та ж залежність у дестабілізації клітин.

Ключові слова: кордова кров, стовбурові клітини, кріоконсервування, життєздатність, ліпідна асиметрія.

CORD BLOOD AS ALTERNATIVE SOURCE OF STEM CELLS FOR REGENERATIVE MEDICINE: NEW APPROACHES TO THE PROBLEM OF CRYOPRESERVATION

L.A.Babiiichuk, P.M.Zubov, V.V.Ryazantsev, O.L.Zubova, O.V.Kudokotseva, T.M.Gurina

Abstract. New effective methods of isolation and cryopreservation of nucleated cells (CD45⁺), including stem cells (CD34⁺) of the human cord blood have been developed. An estimation of the structural and functional integrity and viability of different populations of nucleated cells of the cord blood are indicative of the fact that these methods enable to preserve up to 85 % of CD45⁺-cells and up to 98 % of CD34⁺-cells in a viable state after cryopreservation. Here at the principal losses of CD45⁺-cells occur at the expense of the fraction of granulocytes, and lymphocytes, whereas monocytes are practically completely preserved. While analyzing the changes of lipid asymmetry of membranes using annexin V a similar dependence in cell destabilization is revealed.

Key words: umbilical cord blood, stem cells, cryopreservation, viability, lipid asymmetry.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkov)

Рецензент – доц. Н.В.Черновська

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol. 13, № 4. – P.23-26

Надійшла до редакції 11.07.2009 року