

Криоконсервирование цельной кордовой крови с ПЭО-1500:

оценка стадий апоптоза ядродержащих клеток

Л.А. БАБИЧУК, П.М. ЗУБОВ, О.Л. ЗУБОВА, В.В. РЯЗАНЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Whole Cord Blood Cryopreservation with PEO-1500:

Assessment of Apoptotic Stages in Nucleated Cells

L.A. BABYCHUK, P.M. ZUBOV, O.L. ZUBOVA, V.V. RYAZANTSEV

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

В настоящее время кордовая кровь (КК) признана полноценным источником гемопоэтических стволовых клеток. В ряде работ было показано, что максимально выраженный терапевтический эффект КК проявляется при применении ее без фракционирования. Кроме того, выделение гемопоэтических клеток в отдельную фракцию может снизить эффективность приживления образца за счет удаления аксессуарно-регуляторных клеточных популяций, определяющих их функциональную полноценность. Исходя из этого, большой научный и практический интерес представляют разработка безотмывочного метода долгосрочного хранения цельной кордовой крови с сохранением как клеточных компонентов (ядросодержащие клетки и эритроциты), так и плазмы с биологически активными веществами, а также комплексная оценка клеток на всех стадиях криоконсервирования.

Цель работы – оценка эффективности разработанного нами безотмывочного метода криоконсервирования цельной кордовой крови с непроницающим криопротектором полиэтиленоксидом с м.м. 1500 Да (ПЭО-1500) по определению количества жизнеспособных ядродержащих клеток, а также клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза после размораживания.

Для оценки стадий апоптоза ядродержащих (CD45⁺) клеток КК был использован цитофлуориметрический метод, основанный на комбинации аннексина V и 7AAD – красителя, который легко проникает в клетки на поздних стадиях апоптоза или некроза, но не может попасть в клетки на начальном этапе апоптоза.

Показано, что криоконсервирование КК по разработанному нами методу обеспечивает сохранность большого количества аннексин V⁻/7AAD⁻-клеток (до 77%), что сопоставимо с результатами общепринятого метода замораживания (3°C/мин).

Наибольший интерес представляет определение аннексин V⁻/7AAD⁻-клеток в каждой из популяций (лимфоциты, моноциты, гранулоциты), так как именно эти клетки в полной мере смогут выполнять свои функции при попадании в организм реципиента. Было показано, что процент аннексин V⁻/7AAD⁻-мононуклеаров (лимфоциты, моноциты) после замораживания меньше на 4% по сравнению с общепринятым способом криоконсервирования ядродержащих клеток (3 град/мин). Следует отметить, что популяция гранулоцитов является наиболее криочувствительной, что подтверждается максимальным количеством этих клеток с признаками апоптоза и некроза.

Nowadays a cord blood (CB) is recognized as an integral source of hemopoietic stem cells. In some researches the maximally pronounced therapeutic effect of CB was shown to be manifested when applying it without fractionation. In addition the isolation of hemopoietic cells into separated fraction may reduce the efficiency of sample's engraftment due to the removal of accessory and regulatory cellular populations, determining their functional integrity. Proceeding from this fact, high scientific and practical interest is for developing non-washing method of long-term storage for the whole cord blood with preserving both cellular components (nucleated cells and erythrocytes) and plasm with biologically active substances, as well as complex cell assessment at each stage of cryopreservation.

The research aim was to estimate the efficiency of designed by us non-washing method for the whole cord blood cryopreservation with non-penetrative cryoprotectant polyethylene oxide with molecular weight of 1500 Da (PEO-1500) by examining the number of viable nucleated cells, as well as those, being at different apoptotic stages after freeze-thawing.

To assess the apoptotic stages in nucleated (CD45⁺) CB cells we used the cytofluorimetric method, based on combining Annexin V and 7AAD dye, which penetrates easily into cells at later stages of apoptosis or necrosis, but can not enter into cells at initial stage of apoptosis.

The CB cryopreservation according developed by us method was shown to provide the preservation of a high number of Annexin V⁻/7AAD⁻ cells (up to 77%), that was comparable with the results of the standard freezing method (3°C/min).

Of most interest is the estimation of Annexin V⁻/7AAD⁻ cell content in each population (lymphocytes, monocytes, granulocytes), since namely these cells may fully accomplish their functions when appearing in a recipient's organism. The percentage of annexin V⁻/7AAD⁻ mononuclears (lymphocytes, monocytes) after freeze-thawing was shown to be lower by 4% compared to the standard way of nucleated cell cryopreservation (3 deg/min). Of note is the fact, that the granulocyte population is the most cryosensitive, that is confirmed by the maximum content of these cells with signs of apoptosis and necrosis.