

Оценка гемопоэтического потенциала стволовых кроветворных клеток костного мозга с измененным исходным статусом под действием факторов криоконсервирования

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Ю.А. КОЗЛОВА, Т.Г. ДУБРАВА, Т.М. ГУРИНА, М.В. ОСТАНКОВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Оптимизация методов криоконсервирования костного мозга (КМ) доноров с аутоиммунными заболеваниями (АИЗ) стала актуальной проблемой в связи с востребованностью аутологичного КМ для лечения данных патологий и необходимостью его хранения при субнулевых температурах [1, 2, 8]. Точный механизм реализации такого вида терапии остается неясным. Высказывается предположение, что при повторном прохождении через тимус вновь введенные аутологичные стволовые кроветворные клетки (СКК) и формирующиеся из них иммунокомпетентные клетки могут подвергаться “реставрации”, обеспечивая, таким образом, санацию и реконструкцию иммунной системы [3, 6]. Очевидно, что эффективность аутотрансплантации криоконсервированного КМ будет определяться степенью сохранности различных его клеточных популяций, но в первую очередь, стволовых кроветворных клеток (СКК). Существующие особенности структурно-функциональной организации КМ доноров с АИЗ возможно потребуют особых условий его криоконсервирования.

Цель работы – в системе *in vivo* провести сравнительную оценку функциональной активности СКК разной степени дифференцировки в криоконсервированном в различных режимах КМ здоровых животных и с АИЗ (адьювантным артритом – АА).

Материалы и методы

Все манипуляции с животными выполнены согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г.). Эксперименты проведены на мышах линии СВА/СaLac 4-месячного возраста массой 20-25г. Объектом исследования был КМ здоровых животных (контроль) и с АА, который индуцировали по известному методу [5]. КМ вымывали из бедренных костей средой 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2% цитрата натрия. На этой же среде суспензию клеток криоконсервировали на программном замораживателе “Cryooson” (Германия) под защитой 7 и 10% диметилсульфоксида (ДМСО) (в конечной концентрации) в полиэтиленовых ампулах

Адрес для корреспонденции: Гольцев А.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-57-89, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Нисс объемом 1мл (концентрация $6,0 \times 10^6$ кл/мл). В работе были апробированы программы криоконсервирования со следующими скоростями охлаждения: 1°C/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот – режим 1; 10°C/мин, 10-ти минутная выдержка при температуре -40°C с последующим погружением в жидкий азот – режим 2; 40°C/мин, 10-ти минутная выдержка при температуре -40°C с последующим погружением в жидкий азот – режим 3. Отогрев суспензии проводили на водяной бане при температуре 38-40°C в течении 40-50с, после чего отмывали от криопротектора путем медленного добавления равного объема рабочей среды с последующим центрифугированием.

Количество СКК, формирующих колонии в селезенках летально облученных мышей на 8 (КОЕс-8) и 14 (КОЕс-14) сутки после трансплантации КМ определяли общепринятым методом [7]. КМ в количестве 1×10^5 клеток вводили в хвостовую вену мышей-реципиентов, облученных на установке РУМ-17 в дозе 850 Р. Для оценки распределения в КМ кроветворных клеток с различной степенью дифференцировки (более дифференцированных – КОЕс-8 и менее дифференцированных – КОЕс-14 [4]), был введен индекс пролиферативной активности (ИПА КОЕс), представляющий собой отношение КОЕс-14 к КОЕс-8.

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывались в электронных таблицах Microsoft Excel 2000.

Результаты и обсуждение

Представленные на рисунке данные свидетельствуют о том, что из трех используемых режимов криоконсервирования наибольшую сохранность КОЕс КМ здоровых животных обеспечивал режим 1 с 10% ДМСО (рис., а). При такой же концентрации криопротектора в режиме 2 (рис., б) также сохранялось большее количество КОЕс в КМ, хотя этот результат уступал предыдущему. Обращает на себя внимание тот факт, что медленные скорости замораживания КМ (режимы 1 и 2) со всеми используемыми концентрациями криопротектора обеспечивали сохранность преимущественно менее дифференцированных предшественников – КОЕс-14. О таких перераспределениях

субпопуляций КОЕс в сравнении с контролем свидетельствует ИПА. Однако напротив, КОЕс-14 оказались более лабильными по сравнению с КОЕс-8 при быстрых скоростях замораживания (режим 3) не зависимо от концентрации криопротектора. Кроме того, в отличие от режимов 1 и 2, в данном случае более высокая сохранность КОЕс была получена при использовании 7% ДМСО.

Костный мозг животных с АА по содержанию КОЕс существенно отличался от контроля (см. рис.): на фоне увеличенного в 1,3 раза содержания КОЕс-14, отмечалось снижение почти в 2,5 раза количества КОЕс-8. Это подтверждается существенным повышением ИПА, который составлял 3,65±0,19 усл. ед. (у здоровых животных – 1,0±0,05 усл. ед.).

По особому отвечали КОЕс КМ животных с АА и на факторы криоконсервирования. Режим 1 с 10% концентрацией криопротектора обеспечивал исходную (до замораживания) сохранность КОЕс-8 и снижение примерно на 30% КОЕс-14, что, говорит о сохранении “дисгармонии” соотношения предшественников (ИПА КОЕс более 2,5 усл. ед.). Наиболее сбалансированное соотношение субпопуляций КОЕс отмечалось после криоконсервирования КМ в этом режиме с 7% ДМСО. После трансплантации такого КМ около 65-70% КОЕс-8 и КОЕс-14 сохраняли способность формировать колонии, подчеркивая, что эти условия криоконсервирования (скорость охлаждения 1°С/мин и 7% ДМСО) “гармонизировали” колониеобразующий потенциал КМ животных с АА, приближая его к лучшим показателям криоконсервированного под защитой 10% ДМСО КМ здоровых животных (ИПА 1,12±0,02 и 1,3±0,01 соответственно).

Менее успешным в этом плане был режим 2 (рис., б), хотя также при 7% концентрации протек-

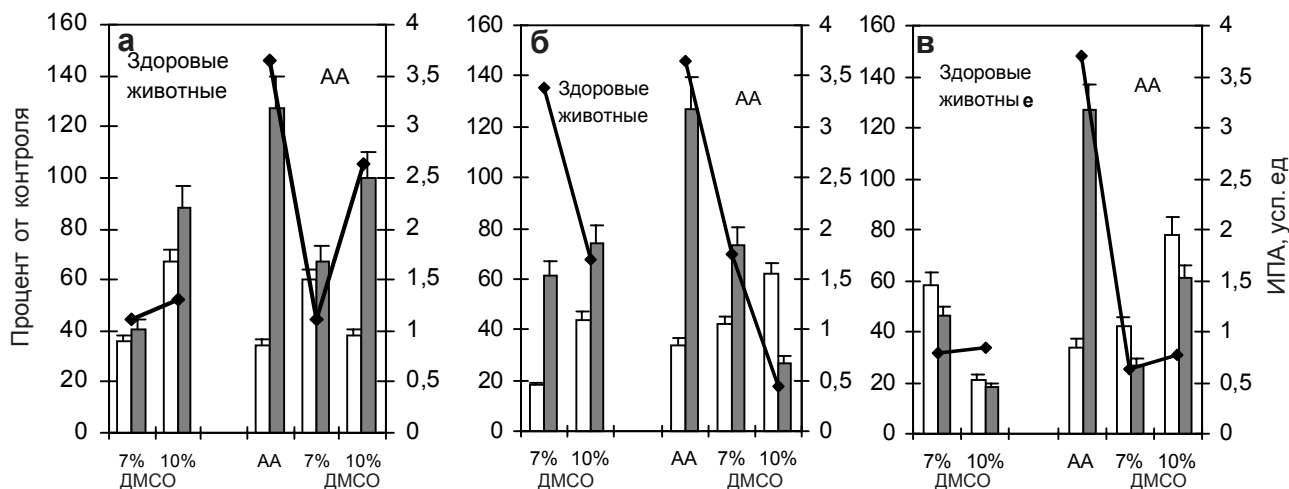
тора отмечены абсолютно идентичные результаты с полученными при криоконсервировании контрольного КМ с 10% ДМСО. В отличие от режима 1, в данном случае при 10% ДМСО колониеобразующий потенциал КМ животных с АА менялся в сторону существенного преобладания менее потентных КОЕс-8. На фоне почти 5-кратного снижения по сравнению с содержанием до криоконсервирования КОЕс-14, количество КОЕс-8 увеличивалось в 1,8 раза, что сопровождалось снижением ИПА до 0,44 усл. ед. Быстрая скорость замораживания (40°С/мин) не зависимо от концентраций криопротектора, как и при криоконсервировании КМ здоровых животных, в большей степени ингибировала функцию КОЕс-14 (рис., в). Однако в противоположность КМ здоровых животных, 10% концентрация ДМСО обеспечивала почти в два раза лучшие результаты, чем 7%, а также прекрасный “гармонизирующий” эффект соотношения субпопуляций КОЕс (ИПА – 0,78±0,03).

Выводы

1. СКК КМ животных с АА обладают измененным исходным статусом по сравнению с СКК здоровых животных.

2. Идентичные условия криоконсервирования КМ здоровых животных и с АА вызвали неоднотипное перераспределение субпопуляций КОЕс разного уровня дифференцировки (КОЕс-8 и КОЕс-14). В то же время, “оптимальными” в отношении обеспечения функционального потенциала этих клеток в одном и другом КМ оказались различные условия криоконсервирования: для КМ животных с АА – режим 3 с 10% ДМСО, для КМ здоровых животных – режим 1 с 10% ДМСО.

3. Криоконсервирование КМ с использованием как медленных скоростей охлаждения (10°С/мин



Содержание КОЕс в КМ, криоконсервированном со скоростью 1°С/мин (режим 1 – а), 10°С/мин (режим 2 – б) и 40°С/мин (режим 3 – в). □ – КОЕс-8; ■ – КОЕс-14. За 100% принято количество колоний, формируемых нативным КМ здоровых животных, ИПА нативного КМ здоровых животных равен 1.

и 1°С/мин) с 7% ДМСО, так и быстрой скорости (40°С/мин) с 10% ДМСО обеспечивает эффект “рестаурации” колониобразующего потенциала СКК, модифицированного патологией.

Литература

1. *Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г., Останков М.В.* Модификация состояния кроветворных клеток костного мозга после криоконсервирования // Матер. междунар. конф. “Сохранение генетических ресурсов”.– Санкт-Петербург, 2004.– С.783-784.
2. *Козлова Ю.А., Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Гурина Т.М.* Предпосылки оптимизации метода криоконсервирования костного мозга животных с аутоиммунной патологией // Пробл. криобиологии.– 2004.– №2.– С. 76-83.
3. *Burt R.K., Slavin S., Burns W.H., Marmont A.M.* Induction of tolerance in autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation: getting closer to a cure? // Blood.– 2002.– Vol. 99., N3.– P. 768-784.
4. *Lord B.I., Woolford L.B.* Proliferation of spleen colony forming units (CFU-S8, CFU-S13) and cells with marrow repopulating ability // Stem cells.– 1993.– Vol. 11.– P. 212-217.
5. *Pearson C.M., Wood F.D.* Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant // Am. J. Pharm.– 1963.– Vol. 42.– P. 73-95.
6. *Porta C., Capolari R., Elis O., et al.* Impaired bone marrow hematopoietic progenitor cell function in rheumatoid arthritis patients candidate to autologous hematopoietic stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant.– 2004.– Vol. 33, N7.– P. 721-728.
7. *Till J.E., McCulloch E.A.* A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Rad. Res.– 1961.– Vol.14, N12.– P. 213-222.
8. *Tyndall A.* Haematological stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases: first experiences from an international project // J. Rheumatol.– 1999.– Vol. 38, N4.– P. 482-488.